

# Untersuchungen zur molekularen und biologischen Funktion des Transkriptionsfaktors Sp2



## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Kerstin Nau**  
aus Fritzlar

Marburg an der Lahn 2012

Vom Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation angenommen am: 07.05.2012

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Guntram Suske

Tag der mündlichen Prüfung am: 06.06.2012

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Familie der Sp/KLF Transkriptionsfaktoren.....	1
1.2 Die Transkriptionsfaktoren Sp1 bis Sp4.....	3
1.3 Der Transkriptionsfaktor Sp2 .....	5
1.4 Ziele dieser Arbeit .....	9
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>10</b>
2.1 Sicherheit.....	10
2.2 Material .....	10
2.2.1 Chemikalien, Reagenzien, Geräte, Verbrauchsmaterialien .....	10
2.2.2 Lösungen und Puffer .....	11
2.2.3 Enzyme .....	12
2.2.4 Bakterienstämme, Kulturmedien und Antibiotika .....	12
2.2.5 Hefestämme und Kulturmedien .....	13
2.2.6 Zelllinien und Kulturmedien .....	16
2.2.7. Plasmide.....	17
2.2.7.1 Bereits vorhandene Plasmide .....	17
2.2.7.2 Für diese Arbeit hergestellte Plasmide .....	19
2.2.8 Oligonukleotide.....	21
2.2.8.1 Primer für Genotypisierungen .....	22
2.2.8.2 Primer für Klonierungen .....	23
2.2.8.3 Oligonukleotide für Gelretardationsexperimente .....	24
2.2.9 Antikörper und Antiseren .....	24
2.2.10 Inzucht-Mausstamm und Mauslinien .....	26
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	27
2.3.1 Standardmethoden der Molekularbiologie .....	27
2.3.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten für die Ligation .....	27
2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA.....	27
2.3.4 Herstellung von DNA-Fragmenten für Klonierungen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	28
2.3.5 Einführung von Deletionen in Plasmid-DNA mittels PCR .....	29
2.3.6 Genotypisierung mittels PCR .....	29
2.3.7 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden .....	30
2.4 Biochemische Methoden.....	32
2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry .....	32
2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	32
2.4.3 Herstellung von SDS-Gesamtzellextrakten .....	33
2.4.4 Herstellung von Kernextrakten mit physiologischer Salzkonzentration .....	33
2.4.5 Herstellung von Hochsalz-Kernextrakten .....	35
2.4.6 Aufreinigung von Proteinen über einen Flag-Tag für Massenspektrometrie .....	36
2.4.7 Aufreinigung von Proteinen über einen Flag-Tag für EMSA.....	37
2.4.8 Co-Immunpräzipitation .....	39
2.4.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	40
2.4.10 Coomassie Brilliant Blau Färbung .....	41
2.4.11 Silberfärbung von Proteingelen .....	42

2.4.12 Western Blot und Immundetektion.....	43
2.4.13 Größenfraktionierung mittels Superose 6 Säule.....	44
2.4.14 Gelretardationsexperiment .....	45
2.4.15 Dualer Luciferase Assay.....	47
2.4.16 Gekoppelte in vitro Transkription/Translation mit anschließender Co-Immunpräzipitation .....	48
2.5 <i>Arbeiten mit eukaryontischen Zellen und Mäusen</i> .....	50
2.5.1 Das Hefe-Zwei-Hybrid System: Prinzip und Ablauf .....	50
2.5.1.1 Transformation von Hefezellen .....	51
2.5.1.2 Mating und Selektion .....	52
2.5.1.3 Kolonie-PCR .....	53
2.5.1.4 Plasmidextraktion aus Hefezellen .....	54
2.5.1.5 Herstellung von SDS-Gesamtzellextrakten aus Hefe.....	55
2.5.2. Umgang mit Zellkulturen.....	55
2.5.3 Transfektion von Zellen .....	56
2.5.4 Herstellung von murinen embryonalen Fibroblasten .....	57
2.5.5 Immunfärbung von Zellen.....	59
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>61</b>
3.1 <i>Analyse der DNA-Bindungseigenschaften von Sp2</i> .....	61
3.1.1 DNA-Bindung von Gal4-Sp2 Fusionsproteinen .....	61
3.1.2 DNA-Bindung von Gal4-Sp2 Fusionsproteinen mit Deletionen im Bereich von Aminosäuren 46-97 .....	64
3.1.3 DNA-Bindung von Sp-Faktoren nach Aufreinigung über einen Flag-Tag ..	66
3.1.4 DNA-Bindung von HA-Flag-Sp2 Fusionsproteinen nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase.....	67
3.1.5 DNA-Bindung von HA-Flag-Sp2 Fusionsproteinen nach Behandlung mit Phosphatase-Inhibitoren.....	69
3.1.6 DNA-Bindung von N-terminalen HA-Flag-Sp2 Deletionsmutanten .....	69
3.1.7 DNA-Bindung von HA-Flag-Sp Fusionsproteinen nach Behandlung mit RNaseA oder RNase Inhibitor .....	73
3.1.8 DNA-Bindung von HA-Flag-Sp2 Fusionsproteinen nach internen Deletionen .....	73
3.1.9 Zusammenfassung: DNA-Bindungseigenschaften von Sp2 .....	76
3.2 <i>Größenfraktionierung mittels Gelchromatographie</i> .....	77
3.2.1 Sp2 befindet sich in hochmolekularen Fraktionen .....	77
3.2.2 Größenfraktionierung von Gal4-Sp2 (6-215) .....	80
3.3 <i>Hefe-zwei-Hybrid System</i> .....	82
3.4 <i>Massenspektrometrie</i> .....	91
3.5 <i>Subzelluläre Lokalisation von Sp2 Protein</i> .....	116
3.6 <i>Untersuchungen zur Funktion von Sp2 im Mausmodell</i> .....	119
3.6.1 Phänotyp von Sp2ko/ko MEFs .....	120
3.6.2 Phänotyp von Sp2 lzn/lzn MEFs.....	122
3.6.3 Herstellung einer konditionellen Sp2 knock-out Maus .....	124
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>130</b>
4.1 <i>DNA-Bindungseigenschaften von Sp2</i> .....	130

4.2 Potentielle Interaktionspartner von Sp2 .....	135
4.2.1 Säulenchromatographie .....	135
4.2.2 Hefe-zwei-Hybrid System .....	136
4.2.3 Co-Immunpräzipitation und Massenspektrometrie .....	140
4.3 Subzelluläre Lokalisation von Sp2 Protein .....	145
4.4 Funktion von Sp2 in der Maus .....	147
4.4.1 Phänotypen von MEFs .....	147
4.4.2 Herstellung einer Sp2cko-Mauslinie .....	148
4.5 Fazit und Ausblick .....	150
<b>5. Anhang .....</b>	<b>151</b>
5.1 Literaturverzeichnis .....	151
5.2 Abkürzungsverzeichnis .....	158
5.3 Zusammenfassung .....	161
5.4 Summary .....	163
5.5 Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
5.6 Publikationen .....	166
5.7 Danksagung .....	168
5.8 Erklärung .....	169

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Familie der Sp/KLF Transkriptionsfaktoren

Die im Folgenden beschriebenen Informationen können, soweit nicht anders angegeben, einer Reihe von Übersichtsartikeln entnommen werden (Philipsen und Suske 1999, Suske 1999, Bouwman und Philipsen 2002 und Suske et al., 2005).

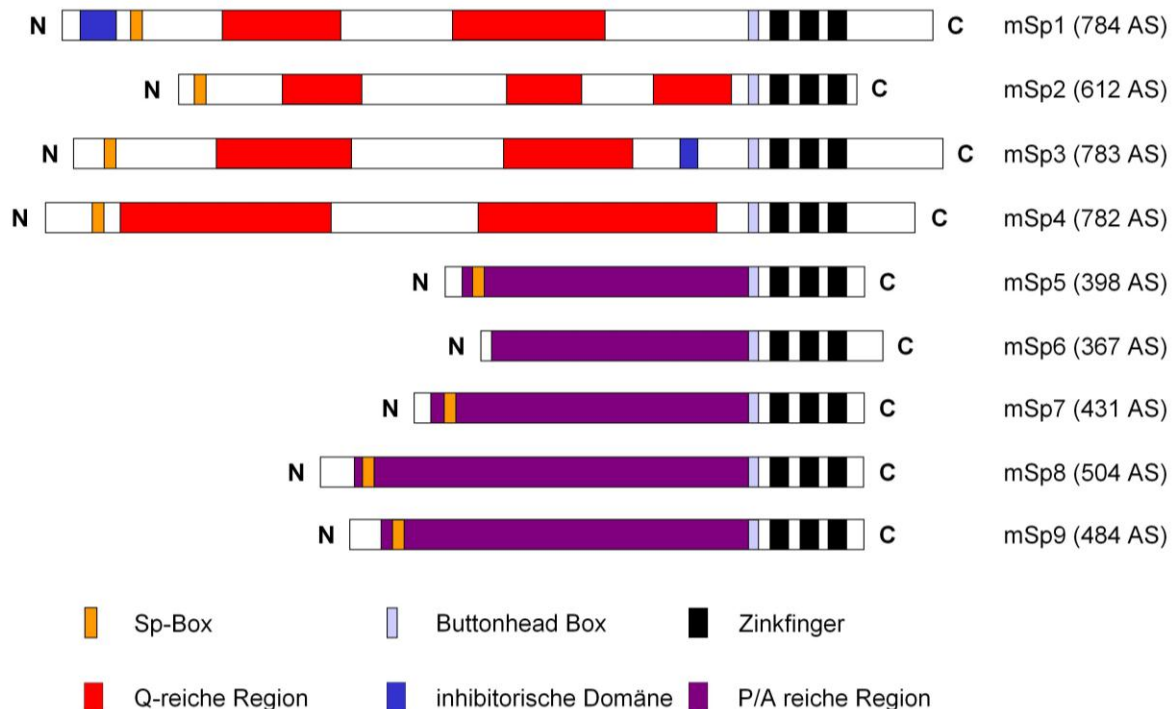
Der Familie der *Specificity protein/Krüppel like factor* (Sp/KLF) Transkriptionsfaktoren gehören mit Sp1 bis Sp9 und KLF1 bis KLF16 in Säugern 25 Proteine an. Auch in anderen multizellulären Organismen, wie *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und vermutlich allen Vertebraten, findet man verwandte Proteine, nicht aber in eukaryontischen Einzellern wie der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Mitglieder der Sp/KLF Proteinfamilie wurden aufgrund ihrer Bindung an GC-reiche DNA-Sequenzen identifiziert und zeichnen sich durch das Vorhandensein einer hochkonservierten DNA-Bindungsdomäne aus. Diese besteht aus drei Zinkfingern vom Typ Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> und befindet sich am C-Terminus der Proteine. Die Zinkfinger ermöglichen die Bindung an GC-reiche DNA-Elemente, sogenannte GC-(GGGGCGGGG) oder GT/CACCC- (GGTGTGGGG) Boxen, die sich in Promotoren oder distalen Kontrollregionen befinden können.

Die Untergruppe der Sp-Transkriptionsfaktoren (Sp1-Sp9, Abb. 1.1) weist zusätzlich zur Zinkfingerregion noch weitere konservierte Domänen auf. Dabei handelt es sich zum Einen um die Buttonhead (Btd)- Box CXCPXC, die sich direkt vor der Zinkfingerregion befindet. Die Btd-Box wurde zuerst im *Drosophila* Transkriptionsfaktor Buttonhead, der für die korrekte Entwicklung des Kopfes erforderlich ist, identifiziert und ist auch in Sp-ähnlichen Proteinen in *C. elegans* zu finden. Ihre Funktion ist bislang unbekannt, aber ihre hohe Konservierung deutet auf eine wichtige physiologische Funktion hin. Als dritte hochkonservierte Domäne besitzen die Faktoren Sp1 bis Sp9 (außer Sp6) eine N-terminale Sp-Box (SPLALLAATCSR/KI), deren Funktion ebenso wie die der Buttonhead Box bisher unbekannt ist. Im menschlichen Genom sind jeweils 2-3 Sp-Gene und ein HOX Gencluster auf einem Chromosom nebeneinander angeordnet (Chromosom 12q: Sp7, Sp1, HOXC; Chromosom 17q: Sp6, Sp2, HOXB; Chromosom 2q: Sp5, Sp3, Sp9, HOXD; Chromosom 7p: Sp8, Sp4, HOXA). Im murinen Genom sind Sp4/Sp8 nicht mehr physisch mit dem HOXA Gencluster assoziiert, befinden sich aber in einer chromosomalen Region, die dem humanen Chromosom 7p homolog ist. Diese

Anordnung deutet darauf hin, dass die verschiedenen Sp-Faktoren während der Evolution durch Duplikationen entstanden sind.

Eine Untergruppe bilden die Transkriptionsfaktoren Sp1 bis Sp4, da sie zusätzlich zu Sp-Box und Btd-Box als weitere Gemeinsamkeit glutaminreiche Aktivierungsdomänen besitzen. In der Nachbarschaft dieser glutaminreichen Domänen finden sich serin- und threoninreiche Regionen. Die Transkriptionsfaktoren Sp5 bis Sp9 besitzen dagegen prolin- oder alaninreiche Regionen und weisen abgesehen von Zinkfingerregion, Sp-Box und Btd-Box, keine weitere Ähnlichkeit zueinander auf.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Familie der Sp/KLF Transkriptionsfaktoren aus drei Untergruppen besteht: (i) den klassischen Sp-Faktoren Sp1 bis Sp4, (ii) den eng verwandten Faktoren Sp5 bis Sp9, die mit Sp1 bis Sp4 Zinkfingerregion, Sp-Box und Btd-Box gemeinsam haben und (iii) den KLF-Transkriptionsfaktoren, die mit den Sp-Faktoren nur die Zinkfingerregion gemeinsam haben.



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der murinen Transkriptionsfaktoren Sp1 bis Sp9.** Alle Sp-Faktoren besitzen drei Zinkfinger vom Typ  $C_2H_2$  (schwarz), eine Buttonhead-Box (hellblau; CXCPXC) und, abgesehen von Sp6, eine N-terminale Sp-Box (orange, SPLALLAATCSR/KI). Die glutaminreichen Domänen, die Sp1 bis Sp4 kennzeichnen, sind rot hervorgehoben. Sp5 bis Sp9 weisen prolin- oder alaninreiche Domänen (lila) auf. Sp1 und Sp3 besitzen zudem inhibitorische Domänen (dunkelblau) (Modifiziert nach Bouwman und Philipsen 2002).

---

## 1.2 Die Transkriptionsfaktoren Sp1 bis Sp4

In der Gruppe der Sp-Transkriptionsfaktoren besitzen Sp1, Sp2, Sp3 und Sp4 die größte Ähnlichkeit zueinander. Alle vier Faktoren weisen einen ähnlichen modularen Aufbau auf, der sich auch in ihrer Exon/Intron Struktur widerspiegelt. Sie besitzen zusätzlich zu Zinkfingern, Sp-Box und Btd-Box glutaminreiche Regionen, die häufig Aktivierungsdomänen darstellen. Während diese glutaminreichen Regionen in Sp1, Sp3 und Sp4 eine aktivierende Funktion besitzen (Suske 1999), gibt es jedoch bisher keinen Nachweis einer Promotoraktivierung durch Sp2.

Als erstes Mitglied der Sp/KLF Familie in Säugern wurde Sp1 identifiziert und kloniert. Dies geschah aufgrund seiner Bindung an GC-Boxen im *Simian Virus 40* (SV-40) *early* Promotor (Dyran und Tjian, 1983). Die übrigen Sp-Faktoren wurden in den folgenden Jahren identifiziert (Kingsley und Winoto 1992, Hagen et al., 1992).

Phylogenetische Analysen ergaben, dass Sp1 und Sp3 einander am ähnlichsten sind und vermutlich durch Duplikation von Sp4 entstanden sind. Der N-Terminus von Sp2 ist zwar ebenfalls reich an Glutaminresten, ähnelt insgesamt aber eher der Gruppe der CCAAT/NF-YC Transkriptionsfaktoren, was auf eine modulare evolutionäre Entstehung hindeutet (Kolell und Crawford, 2002).

Während Sp1 und Sp3 ubiquitär exprimiert werden, wird Sp4 hauptsächlich in neuronalen Zellen exprimiert. Alle drei Faktoren binden an GC-reiche DNA-Elemente, sogenannte GC (GGGGCGGGG)- oder GT/CACCC (GGTGTGGGG)-Boxen. Diese Elemente findet man unter anderem in zahlreichen Promotoren von ubiquitär oder gewebespezifisch exprimierten Genen oder auch viralen Genen. Darunter finden sich Haushaltsgene ebenso wie Gene, die einer spezifischen Regulation unterliegen (wie z.B. Zellzyklus, hormonelle Regulation). Sp1 und Sp4 wirken als Aktivatoren, während Sp3 sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken kann. Dabei wird die Art der Aktivität durch SUMOylierung reguliert: SUMOyliertes Sp3 wirkt inhibitorisch, während die nicht-SUMOylierte Form als starker Aktivator wirkt (Ross et al. 2002, Sapetschnig et al. 2002). Zudem wurde die Acetylierung von Sp3 beschrieben (Braun et al., 2001), die möglicherweise am gleichen Lysin erfolgt wie die SUMOylierung. Bekannte posttranslationale Modifikationen von Sp1 sind Phosphorylierung, Glykosylierung und Acetylierung (Bouwman und Philipsen 2002).

Detaillierte Untersuchungen zur Funktion von Sp1, Sp3 und Sp4 *in vivo* wurden durchgeführt, indem diese Gene im Mausmodell inaktiviert wurden. Dabei wurde deutlich, dass sich die Phänotypen der verschiedenen knock-out Mäuse signifikant



---

voneinander unterscheiden und Sp1, Sp3 und Sp4 somit nicht, wie zuvor angenommen, redundante Funktionen aufweisen.

Der knock-out von Sp1 ist früh-embryonal letal, Sp1ko/ko Embryonen sterben um Tag 10 der Embryonalentwicklung. Murine embryonale Stammzellen, denen Sp1 fehlt, wachsen dagegen normal und sind in der Lage, Embryonalkörperchen zu bilden. Werden diese Stammzellen in Blastozysten injiziert, sind sie bis E10 im Embryo nachweisbar. Danach nimmt ihre Anzahl rapide ab, so dass in neugeborenen Mäusen keine Sp1ko/ko Zellen mehr nachweisbar sind. Diese Befunde weisen darauf hin, dass es sich um einen zellautonomen Phänotyp handelt und dass Sp1 für das Überleben von Zellen nach E10 unabdingbar ist (Marin et al. 1997).

Sp3ko/ko Mäuse entwickeln sich bis zur Geburt, sterben aber innerhalb von zehn Minuten nach der Geburt, weil sie nicht in der Lage sind zu atmen. Außerdem sind sie kleiner als ihre Wurfgeschwister und weisen einen Defekt in der Zahnentwicklung auf (Bouwman et al., 2000). Da der knock-out von Sp3 keinen zellautonomen Phänotyp hervorruft, können murine embryonale Fibroblasten (MEFs) aus Sp3ko/ko Embryonen kultiviert werden (Bouwman et al., 2000).

Sp4ko/ko Mäuse sind prinzipiell lebensfähig, zwei Drittel der Tier sterben aber in den ersten vier Wochen nach der Geburt und diejenigen Sp4ko/ko Tiere, die überleben, sind leichter als ihre Wurfgeschwister. Während Sp4ko/ko Weibchen verspätet geschlechtsreif werden, sind die Männchen nicht in der Lage sich fortzupflanzen, vermutlich wegen neuronaler Störungen (Supp et al., 1996, Göllner et al., 2001).



allein die erwartete Bindung an ein GC-Box Oligonukleotid zeigte. Eine graduelle Zunahme der DNA-Bindung wurde erreicht, wenn der N-Terminus von Sp2 schrittweise verkürzt wurde. Wurde statt der Zinkfinger die DNA-bindende Domäne des Hefe-Transkriptionsfaktors Gal4 mit dem N-Terminus von Sp2 fusioniert, konnte ebenfalls erst nach Verkürzung des N-Terminus eine DNA-Bindung nachgewiesen werden. Außerdem wurde beobachtet, dass Gal4-Sp2 Fusionsproteine, die im EMSA DNA binden, nicht eine klar definierte Bande aufweisen, sondern einen höhermolekularen „Schmier“, was ein Hinweis auf Proteine sein könnte, die unter EMSA-Bedingungen an Sp2 binden. Diese Befunde deuten darauf hin, dass es Bereiche im Sp2 Protein gibt, die die DNA Bindung inhibieren und der Regulation der Aktivität von Sp2 dienen, möglicherweise durch Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen.

Eine nennenswerte Reporter-gen-Aktivierung konnte mit keinem Gal4-Sp2 Fusionsprotein nachgewiesen werden, auch dann nicht, wenn dieses Protein an DNA bindet. Es ist also fraglich, ob Sp2 *in vivo* als transkriptioneller Aktivator wirkt. Eine alternative Funktion wird von Moorefield et al. (2006) vorgeschlagen. Diese Autoren berichten, dass Sp2 in subnuklearen Foci lokalisiert und mit der Kernmatrix assoziiert sei, möglicherweise um dort GC-reiche DNA-Sequenzen zu verankern.

Um die Funktion von Sp2 im Mausmodell untersuchen zu können, wurde in diesem Labor im Rahmen einer Doktorarbeit (Frank Baur 2005 und Baur et al., 2010) eine transgene Mauslinie hergestellt, die es ermöglicht, sowohl einen knock-out als auch einen konditionellen knock-out von Sp2 zu erhalten. Die Herstellung und die Charakterisierung dieser transgenen Mauslinie wird im Folgenden zusammenfassend dargestellt (vgl. Abbildung 1.3). Es wurde eine sogenannte „triple-LoxP“ Strategie angewandt. Dabei macht man sich zunutze, dass DNA-Bereiche, die von LoxP-Sequenzen flankiert werden, durch Cre-Rekombinase entfernt werden können. Für das Targeting wurde Exon 3 des Sp2-Gens ausgewählt. Dieses Exon kodiert für die zwei glutaminreichen Regionen, deren homologe Bereiche in Sp1, Sp3 und Sp4 für die Aktivierungsdomänen kodieren. Es wurde ein transgenes Allel hergestellt, in dem Exon 3 des Sp2 Gens von zwei LoxP-Sequenzen flankiert wird. Im Anschluss befindet sich eine IRES-LacZ-Neomycin Selektionskassette, gefolgt von der dritten LoxP-Sequenz. Dieses transgene Allel wurde mittels homologer Rekombination in murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) eingebracht. Die Selektion auf eine erfolgreiche homologe Rekombination erfolgte auf zwei Arten.

---

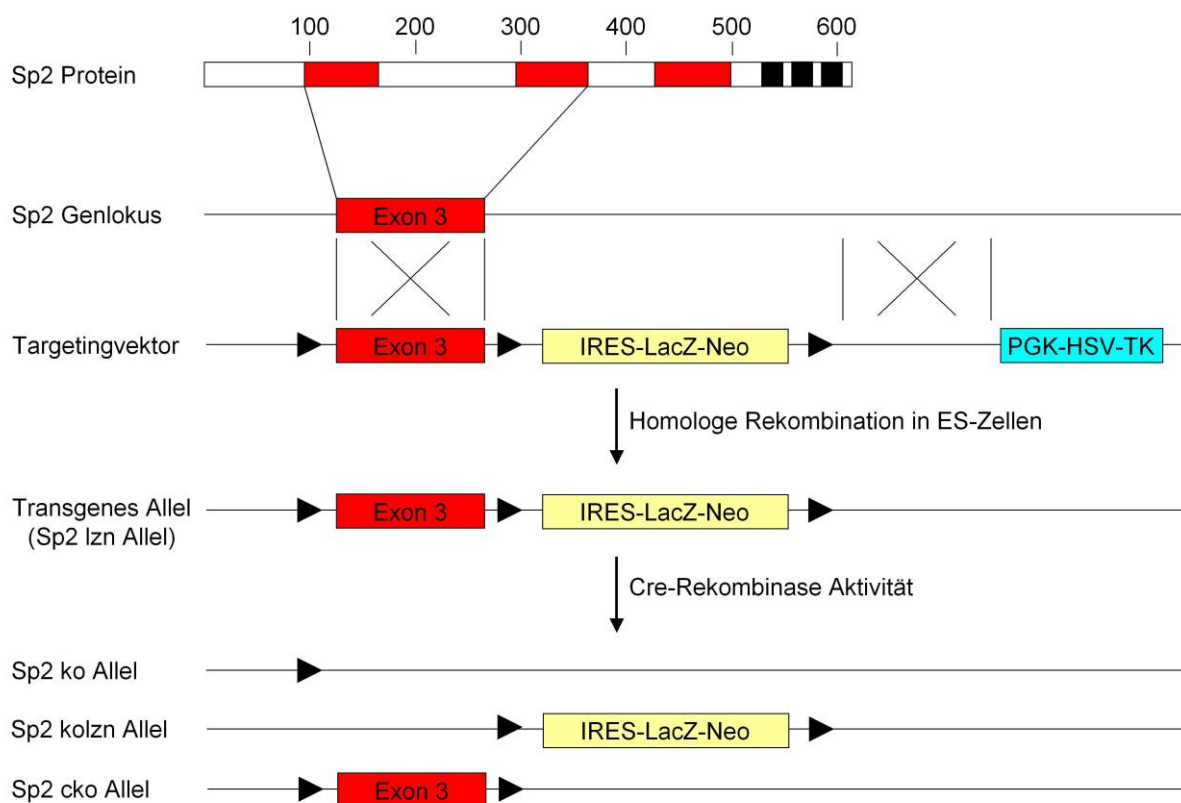
Zum Einen vermittelt das in der Selektionskassette enthaltene Neo-Gen die Resistenz gegenüber Neomycin. Um eine negative Selektion durch Zugabe von Gancyclovir zu ermöglichen, enthielt der Targetingvektor das Thymidinkinase-Gen (TK) aus dem Herpes Simplex Virus (hsv), das nur ins Genom einer ES-Zelle integriert wurde, wenn keine homologe Rekombination am Sp2-Lokus erfolgt war, sondern eine Integration des Transgens an einer anderen Stelle. Die Expression der Thymidinkinase führt zur Phosphorylierung von Gancyclovir, das dann an Stelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird und somit betroffene Zellen tötet.

ES-Zellen, in denen das Transgen in den Sp2-Lokus integriert worden war, wurden in Blastozysten von Albino-Mäusen injiziert. Da die ES-Zellen, in die das Transgen eingebracht wurde, von Agouti-Mäusen stammten, konnten chimäre Nachkommen an ihrer Fellfarbe erkannt werden: Wildtyp-Zellen bewirken weißes Fell, transgene braunes Fell. Chimäre Männchen wurden dann mit Albino-Weibchen gekreuzt. Im Falle einer Keimbahntransmission des Sp2<sup>lzn</sup>-Allels hatten die Nachkommen also braunes Fell und konnten auf diese Weise identifiziert werden.

Mäuse, die heterozygot für das Sp2<sup>lzn</sup> Allel sind (Sp2<sup>wt/lzn</sup>), zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp. Homozygote Sp2<sup>lzn/lzn</sup> Mäuse sind nicht lebensfähig und sterben noch vor der Geburt. Bis zum Tag 18,5 der Embryonalentwicklung (E18,5) sind sie aber noch in annähernd mendelscher Verteilung nachweisbar. Sp2<sup>lzn/lzn</sup> Embryonen sind an E18,5 signifikant kleiner und leichter als ihre Wurfgeschwister, wobei sie aber keinen einheitlichen Phänotyp aufweisen. An E9,5 und E12,5 sind dagegen keine Unterschiede in der Größe der Embryonen zu beobachten. Gelegentlich sind bei E13,5 Embryonen Einblutungen im Nacken festzustellen.

Die Expression von Sp2 im Mausembryo wurde mittels XGal-Färbung analysiert. Dazu wurden Sp2<sup>wt/lzn</sup> Embryonen verwendet, die vom transgenen Sp2 Allel  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ) unter der Kontrolle des endogenen Sp2-Promotors exprimieren. Diese Untersuchung ergab, dass Sp2 im E12,5 Embryo ubiquitär exprimiert wird. Vom Sp2<sup>lzn</sup>-Allel wird zudem ein Transkript aus den Sp2-Exons 1 bis 3 sowie der IRES-LacZ-Neo Selektionskassette hergestellt. Eine entsprechende mRNA konnte mittels Northern Blot nachgewiesen werden. Es ist also nicht auszuschließen, dass Funktionen von Sp2 auf Proteinebene zum Teil erhalten geblieben sein könnten. Aus diesem Grund wurde durch Einkreuzen einer CAG-Cre Mauslinie, die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Hybrid-Promotors (CAG) exprimiert (Sakai und Miyazaki 1997), ein knock-out von Sp2 hergestellt. Dabei

wurden durch die Aktivität der Cre-Rekombinase sowohl Exon 3 des Sp2 Gens als auch die darauf folgende Selektionskassette entfernt. Mäuse, die heterozygot für das Sp2ko-Allel sind, zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp. Der Phänotyp von Sp2ko/ko Mäusen unterscheidet sich signifikant von dem der Sp2lzn/lzn Mäuse. Sp2ko/ko Mäuse sind ebenfalls nicht lebensfähig und sterben bereits um Tag 9,5 der Embryonalentwicklung. Dabei weisen sie eine generelle Entwicklungsverzögerung auf und entsprechen an E9,5 Wildtyp-Embryonen an E8,5 (Baur et al., 2010).



**Abbildung 1.3: Strategie zur Herstellung einer transgenen Sp2-Mauslinie.** Gewählt wurde eine „triple-LoxP“ Strategie, die sowohl die Herstellung einer knock-out Linie als auch einer konditionellen knock-out Linie ermöglicht. Für das Targeting wurde Exon 3 (rot) ausgewählt, das für zwei der glutaminreichen Regionen kodiert, deren homologe Bereiche in Sp1, Sp3 und Sp4 aktivierende Funktion haben. Der Targetingvektor enthielt Exon 3, das von zwei LoxP-Sequenzen (schwarze Pfeile) flankiert wird, gefolgt von einer IRES-LacZ-Neo Selektionskassette (gelb) und der dritten LoxP-Sequenz. Vor Exon 3 und hinter der Selektionskassette befinden sich genomische Sequenzen aus dem Sp2-Lokus, die eine homologe Rekombination ermöglichen. Zur negativen Selektion enthielt der Targetingvektor das Thymidinkinase-Gen (TK) aus dem Herpes Simplex Virus (HSV) unter der Kontrolle des Phosphoglyzeratkinase Promotors (PGK) (blau). Das transgene Allel (Sp2lzn) wurde mittels homologer Rekombination in murine ES-Zellen gebracht. ES-Zellen, in denen die homologe Rekombination am Sp2-Lokus erfolgt war, wurden in Blastozysten injiziert und daraus hervorgegangene Nachkommen auf Keimbahntransmission selektioniert. Durch Cre-Rekombinase Aktivität können aus diesem transgenen Allel drei weitere Allele entstehen: Sp2ko, wenn sowohl Exon 3 als auch die Selektionskassette entfernt werden, Sp2kolzn, wenn Exon 3 entfernt wird und Sp2cko, wenn nur die Selektionskassette entfernt wird.

---

### **1.4 Ziele dieser Arbeit**

Basierend auf den oben aufgeführten Befunden bestand die Zielsetzung dieser Arbeit darin, zunächst die DNA-Bindungseigenschaften von Sp2 weiter zu charakterisieren und regulatorische Bereiche zu identifizieren. Dazu sollten EMSAs durchgeführt und regulatorische Bereiche von Sp2 durch Mutationsanalysen identifiziert werden.

Darüber hinaus sollte durch Größenfraktionierung mittels Säulenchromatographie getestet werden, ob es Proteine gibt, die mit Sp2 interagieren. Um mehr über die physiologische Funktion von Sp2 zu erfahren und um die Regulation der DNA-Bindung von Sp2 aufzuklären, sollten potentielle Interaktionspartner von Sp2 durch das Hefe-zwei-Hybrid System identifiziert werden.

Schließlich sollte die Analyse der biologischen Funktion von Sp2 im Mausmodell fortgesetzt werden. Dazu sollten zum Einen murine embryonale Fibroblasten aus Sp2ko/ko Embryonen hergestellt und für weiterführende Experimente verwendet werden. Zum Anderen sollte eine Mauslinie mit einem konditionellen knock-out von Sp2 hergestellt werden.

---

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Sicherheit**

Gentechnische Arbeiten erfolgten entsprechend den Richtlinien des Gentechnikgesetzes vom 1. Juli 1990 und der Gentechnik-Sicherheitsverordnung vom 14. März 1995. Biologisch kontaminierte Materialien und Lösungen wurden getrennt gesammelt und autoklaviert. Arbeiten mit radioaktiven Substanzen sowie ihre Trennung und Zwischenlagerung erfolgten entsprechend der Strahlenschutzverordnung vom 20. Juli 2001 und der Strahlenschutzanweisung vom 26. Februar 2002. Die Arbeiten mit Tieren erfolgten entsprechend dem Tierschutzgesetz vom 24. Juli 1972 und den Betriebsanweisungen der verschiedenen Tierställe.

### **2.2 Material**

#### **2.2.1 Chemikalien, Reagenzien, Geräte, Verbrauchsmaterialien**

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, soweit nicht zusätzlich erwähnt, von den folgenden Firmen bezogen:

Abcam, Agilent Technologies, Ambion, Amersham Bioscience/GE Healthcare, Applichem, Bayer, BD Bioscience, Boehringer Ingelheim, Braun, Calbiochem/EMD Biosciences, Cambrex, Clontech/Takara, Difco/BD Biosciences, Invitrogen/Gibco, Merck, Millipore, New England Biolabs, PAA Laboratories, Perbio, Promega, Qiagen, Riedel-de-Haen, Roche, Roth, Santa Cruz Biotechnology, Sarstedt, Sigma, Upstate, Whatman.

Die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Bioscience/GE Healthcare, Beckman Coulter, Berthold Technologies, Biometra, Biorad, Biozym, Corning, Eppendorf, Falcon/BD Biosciences, Gilson, Greiner Bio-One, Heraeus/Kendro, Hettich, Hirschmann Laborgeräte, IKA

Labortechnik, Infors, Kimberly-Clark, Kobe, Kodak, Leica, Liebherr, Machery-Nagel, Millipore, MWG Biotech, Nunc, Qiagen, Sartorius, Sorvall Instruments, Starlab, Thermo Fisher Scientific, Whatman

### 2.2.2 Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders angegeben, wurden Lösungen und Puffer mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt.

6x DNA-Auftragspuffer	0,25% (w/v)	Bromphenolblau
	0,25% (w/v)	Xylen-Cyanol FF
	30% (v/v)	Glycerin
	10/1	TE pH 8,0
1x PBS	137 mM	NaCl
(pH 7,4)	2,7 mM	KCl
	10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1x TBE	90 mM	Tris
	90 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA pH 8,0
1x TBS	20 mM	Tris
(pH 7,6)	137 mM	NaCl
10/1 TE	10 mM	Tris/Cl pH 8,0
	1 mM	EDTA pH 8,0
2/0,2 TE	2 mM	Tris/Cl pH 8,0
	0,2 mM	EDTA pH 8,0



### 2.2.3 Enzyme

Restriktionsenzyme und andere DNA-modifizierende Enzyme wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Invitrogen/Gibco, New England Biolabs und Roche bezogen.

### 2.2.4 Bakterienstämme, Kulturmedien und Antibiotika

Alle Arbeiten mit *Escherichia coli* Bakterien wurden unter semi-sterilen Bedingungen am Bunsenbrenner mit vollständig geöffneter Luftzufuhr durchgeführt. Die Inkubation von Bakterienkulturen erfolgte bei 37°C; Flüssigkulturen wurden bei 200 Upm geschüttelt. Für Plasmidpräparationen wurden ultrakompetente NEB5 $\alpha$  (New England Biolabs) verwendet. Alle Kulturmedien wurden mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt und vor der Verwendung autoklaviert. Soweit möglich wurden Gefäße ebenfalls vor dem Gebrauch autoklaviert oder es wurde sterile Plastikware verwendet.

Luria-Bertani Medium (LB)	10 g/l	Trypton
	10 g/l	NaCl
	5 g/l	Hefeextrakt
LB-Agarplatten	1 l	LB-Medium
	15 g	Agar
SOB-Medium	20 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	0,584 g/l	NaCl
	0,186 g/l	KCl
SOC-Medium	10 ml	SOB-Medium
	100 $\mu$ l	2M Mg <sup>2+</sup> (1M MgCl <sub>2</sub> , 1M MgSO <sub>4</sub> )
	100 $\mu$ l	2M Glucose

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Medien wurden je nach Bedarf die folgenden Antibiotika zugegeben:

---

Ampicillin	50 µg/ml	LB-Medium
Kanamycin	50 µg/ml	LB-Medium

### 2.2.5 Hefestämme und Kulturmedien

Alle Arbeiten mit *S. cerevisiae* fanden unter semi-sterilen Bedingungen am Bunsenbrenner bei vollständig geöffneter Luftzufuhr statt. Soweit möglich wurden Gefäße und Lösungen vor dem Gebrauch durch Autoklavieren sterilisiert oder es wurde sterile Einwegplastikware verwendet.

Die dauerhafte Lagerung von Hefestämmen erfolgte in 25% Glycerin in YPD-Flüssigmedium. Durch Ausstreichen von Zellen aus diesen Stammlösungen auf YPD-Medium und Inkubation bei 30°C bis zur gewünschten Koloniegröße (2-4 mm) wurden Stammplatten hergestellt und für maximal 4 Wochen bei 4°C gelagert.

Verwendet wurden die *Saccharomyces cerevisiae* Stämme AH109 und Y187 (Matchmaker System, Clontech). Der Stamm AH109 hat den folgenden Genotyp (James et al., 1996):

MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, ade2-101::GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-LacZ, MEL1

Der Stamm AH109 besitzt den Mating-Type „a“ und ist auxotroph für folgende Aminosäuren und Basen: Tryptophan (trp), Leucin (leu), Uracil (ura), Histidin (his), und Adenin (ade). Außerdem wurde das Gal4-Gen deletiert, sodass GAL4-abhängige Promotoren nicht aktiviert werden können. Die folgenden Gal4-abhängigen Reportergene wurden durch homologe Rekombination eingebracht: HIS3 (Histidinsynthese), ADE2 (Adeninsynthese), MEL1 (α-Galaktosidase).

Der Stamm Y187 besitzt folgenden Genotyp (Harper et al, 1993):

Matα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, met-, URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-LacZ, MEL1

Der Mating-Type dieses Stammes ist „α“, daher ist ein Mating der beiden haploiden Stämme AH109 und Y187 möglich. Dabei entstehen diploide Hefezellen, die die Genotypen beider Ausgangsstämme vereinen. Der Stamm Y187 ist auxotroph für Tryptophan, Leucin, Uracil, Histidin, und Adenin, das Gal4-Gen wurde deletiert. Als

Reportergene wurden LacZ und MEL1 eingebracht. Diploide Zellen, die durch ein Mating zwischen AH109 und Y187 entstanden sind, sind also ebenfalls auxotroph für Tryptophan, Leucin, Uracil, Histidin und Adenin und besitzen kein Gal4-Gen. Als GAL4-abhängige Reportergene fungieren HIS3, ADE2, MEL1 und LacZ.

Alle Medien wurden mit entmineralisiertem Wasser angesetzt. Glucose wurde, außer für YDP/YPDA-Medien, stets separat als 20%ige (w/v) Lösung autoklaviert, um eine Dunkelfärbung des Mediums durch Oxidation der Glucose zu vermeiden. Agar wurde ebenfalls separat autoklaviert und anschließend unter Rühren mit dem Basismedium und der Glucose vermischt. X- $\alpha$ -Gal wurde nach dem Abkühlen zugegeben. Alle synthetisch definierten (*synthetically defined*, SD) Medien wurde ohne Zugabe von Agar auch als Flüssigmedien hergestellt. SD-Medium ohne Tryptophan und Leucin wird als *double drop-out* (DDO)-Medium bezeichnet. Fehlen drei Aminosäuren (Tryptophan, Leucin und Histidin), wird das Medium als *triple drop-out* (TDO) bezeichnet und als *quadruple drop-out* (QDO), wenn außerdem noch Adenin fehlt.

YPD	20 g/l	Pepton (Tryptisch verdautes Casein, Roth)
	20 g/l	Glucose-Monohydrat (Merck)
	10 g/l	Hefeextrakt (Roth)
YPD-Agar	1 l	YPD
	30 g	Agar (Roth)
YPDA	20 g/l	Pepton (Tryptisch verdautes Casein, Roth)
	20 g/l	Glucose-Monohydrat (Merck)
	10 g/l	Hefeextrakt (Roth)
	20 mg/l	Adenin-Hemisulfat (Roth)
SD/-Trp	6,7 g/l	Hefe Stickstoff-Basismedium (Roth)
	0,6 g/l	QDO Supplement (Clontech)
	20 mg/l	Adenin-Hemisulfat (Roth)
	10 mg/l	L-Histidin (Roth)
	50 mg/l	L-Leucin (Serva)
	30 g/l	Agar (Roth)

---

	20 g/l	Glucose-Monohydrat (Merck)
SD/-Leu	6,7 g/l	Hefe Stickstoff-Basismedium (Roth)
	0,6 g/l	QDO Supplement (Clontech)
	20 mg/l	Adenin-Hemisulfat (Roth)
	10 mg/l	L-Histidin (Roth)
	10 mg/l	L-Tryptophan (Roth)
	30 g/l	Agar (Roth)
	20 g/l	Glucose-Monohydrat (Merck)
SD/-Leu-Trp (DDO)	6,7 g/l	Hefe Stickstoff-Basismedium (Roth)
	0,6 g/l	QDO Supplement (Clontech)
	20 mg/l	Adenin-Hemisulfat (Roth)
	10 mg/l	L-Histidin (Roth)
	30 g/l	Agar (Roth)
	20 g/l	Glucose-Monohydrat (Merck)
SD/-Leu-Trp-His (TDO)	6,7 g/l	Hefe Stickstoff-Basismedium (Roth)
	0,6 g/l	QDO Supplement (Clontech)
	20 mg/l	Adenin-Hemisulfat (Roth)
	30 g/l	Agar (Roth)
	20 g/l	Glucose-Monohydrat (Merck)
SD/-Leu-Trp-His-Ade (QDO)	6,7 g/l	Hefe Stickstoff-Basismedium (Roth)
	0,6 g/l	QDO Supplement (Clontech)
	30 g/l	Agar (Roth)
	20 g/l	Glucose-Monohydrat (Merck)
X- $\alpha$ -Gal	1 l	SD-Medium
	2 ml	X- $\alpha$ -Gal (20 mg/ml in Dimethylformamid)

HEK293	Eine mit DNA des Adenovirus 5 transformierte humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie (Graham et al., 1977).
--------	---

MEF Murine embryonale Fibroblasten; primäre Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit aus Mausembryonen in Kultur genommen wurden.

HEK-Medium: Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)/ HAM`s F12 Mix (Gibco)  
10% (v/v) fötales Kälberserum (PAA)  
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (PAA)

MEF-Medium: 44,5% (v/v)	DMEM (Gibco)
44,5% (v/v)	HAM's F10
10% (v/v)	fötales Kälberserum (PAA)
1% (v/v)	Penicillin/Streptomycin (PAA)

SL2-Medium: Schneider`s *Drosophila* Medium + L-Glutamin (Gibco)  
10% (v/v) fötales Kälberserum (PAA)  
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (PAA)

---

## 2.2.7. Plasmide

### 2.2.7.1 Bereits vorhandene Plasmide

#### Expressionsplasmide für *Drosophila* Zellen

##### **pPAC-HD-Flag-mSp2**

Expressionsplasmid, das für murines Sp2 mit einem N-terminalen HA- und Flag-Epitop kodiert (Sadic, 2009).

##### **pPAC-HD-Flag-mSp2 (1-112 + 449-612)**

##### **pPAC-HD-Flag-mSp2 (113-224 + 449-612)**

##### **pPAC-HD-Flag-mSp2 (228-339 + 449-612)**

##### **pPAC-HD-Flag-mSp2 (337-448 + 449-612)**

##### **pPAC-HD-Flag-mSp2 (449-612)**

Expressionsvektoren, die für verschiedene Deletionsmutanten des murinen Sp2 mit N-terminalem HA- und Flag-Epitop kodieren (Sadic, 2009). Alle enthalten die Zinkfingerregion von Sp2 (AS 449-6129) fusioniert mit den angegebenen N-terminalen Bereichen.

##### **pPAC-HD-Flag-Sp1**

##### **pPAC-HD-Flag-Sp3**

##### **pPAC-HD-Flag-Sp4**

Expressionsvektoren für die Transkriptionsfaktoren Sp1, Sp3 und Sp4 mit N-terminalem HA- und Flag-Epitop.

#### Expressionsplasmide für Säugerzellen

##### **pSG424-Gal4**

Plasmid zur Expression der DNA-bindenden Domäne des Transkriptionsfaktors Gal4 (Gal4-BD, Aminosäuren 1-145) unter der Kontrolle des SV-40 Promotors.

**pSG424-Sp1A**

Plasmid zur Expression von Gal4-BD-Sp1 (1-186) unter der Kontrolle des SV-40 Promotors.

**pGAWG5E1b**

Expressionsplasmid für Firefly-Luciferase unter der Kontrolle eines Minimalpromotors mit fünf Gal4-Bindestellen und der TATA-Box des adenoviralen E1b Gens.

**pRL-SV40**

Expressionsplasmid für Renilla-Luciferase unter der Kontrolle des SV-40 Promotors (Promega).

**pCMV-Sport6-mSp2**

Expressionsplasmid für murines Sp2 unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Baur 2005).

**pMyc-RACK1**

Expressionsplasmid für RACK1 (Receptor for Activated C-Kinase 1) mit einem N-terminalen Myc- und 6x His Epitop, das von Dieter Adam zur Verfügung gestellt und in Tcherkasowa et al., 2002 beschrieben wurde. Das Plasmid basiert auf pcDNA3.1/myc-His (-) A (Invitrogen) und verfügt über einen CMV- und einen T7 Promotor.

**Expressionsplasmide für Hefezellen****pGBKT7**

Dieser Vektor der Firma Clontech dient der Expression von Gal4-BD Fusionsproteinen für das Hefe-zwei-Hybrid System unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven ADH1 Promotors. Im Anschluss an die Sequenz, die für Gal4-BD (1-147) kodiert, befindet sich ein T7-Promotor, der eine in vitro Transkription/Translation ermöglicht, ein c-Myc Epitop und eine *multiple cloning site*. Die Transkription wird durch ein T7/ADH1 Terminationssignal beendet. Als Selektionsmarker für Bakterien enthält dieser Vektor ein Kanamycin-Resistenzgen und den Marker TPR1 für nutritive Selektion in Hefezellen durch Aufhebung der Auxotrophie für Tryptophan.

**pFBT9**

Dieser Vektor ist ein Derivat von pGBT9 (Clontech) und unterscheidet sich von pGBT9 nur dadurch, dass er Bakterien eine Kanamycin-Resistenz anstelle einer Ampicillin-Resistenz vermittelt. Er dient der Expression von Gal4-BD Fusionsproteinen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven ADH1-Promotors. Die Termination der Transkription erfolgt durch das AHD1-Terminationssignal. Als Marker für die nutritive Selektion in Hefe dient das TRP1-Gen.

**pGADT7-RecAB**

Dieser Vektor wurde von der Firma Clontech bezogen und enthält die Mate and Plate<sup>TM</sup> Library – Universal Human (Normalized). Er kodiert für die Gal4-Aktivierungsdomäne und humane cDNA, so dass Fusionsproteine aus Gal4-AD und unbekannten Proteinen entstehen. Die Expression dieser Fusionsproteine steht unter der Kontrolle des ADH1 Promotors und wird terminiert durch den ADH1 Terminator. Der Gal4-AD vorgeschaltet ist das SV-40 Kernlokalisierungssignal, so dass Fusionsproteine in den Zellkern transportiert werden. Für die in vitro Transkription/Translation ist im Anschluss an die Sequenz für die Gal4-AD ein T7-Promotor enthalten sowie ein HA-Epitop zur Detektion der so hergestellten Proteine.

**2.2.7.2 Für diese Arbeit hergestellte Plasmide****Expressionsplasmide für Drosophila Zellen****pPAC-HD-Flag-mSp2 (356-612)****pPAC-HD-Flag-mSp2 (379-612)****pPAC-HD-Flag-mSp2 (400-612)**

Expressionsplasmide für N-terminale Deletionsmutanten des murinen Sp2 mit N-terminalem HA- und Flag-Epitop. Die entsprechenden Sp2-Fragmente wurde mittels PCR mit den Primern mSp2fw356XhoI, mSp2fw379XhoI, Sp2fw400XhoI und mSp2aa448rBamHI von pN3-mSp2-3xFlag amplifiziert, mit XhoI und BamHI geschnitten und in den mit XhoI und BamHI linearisierten Vektor pPAC-HD-Flag-mSp2 (449-612) ligiert.



**pPAC-HD-Flag-mSp2 del1****pPAC-HD-Flag-mSp2 del1+2****pPAC-HD-Flag-mSp2 del1+2+3**

Expressionsplasmide für murines Sp2 mit internen Deletionen. Dazu wurden in pPAC-HD-Flag-mSp2 durch Verwendung von 5`phosphorylierten Primern und anschließender Ligation des linearen PCR-Produkts (vgl. 2.3.5 und Tabelle 2.2.8.2 b) nacheinander drei Deletionen in der für mSp2 kodierenden Sequenz eingeführt. Deletion 1 (del1) umfasst die Aminosäuren 46-97; Deletion 2 (del2) Aminosäuren 174-192 und Deletion 3 (del3) Aminosäuren 397-417.

**Expressionsplasmide für Säugerzellen****pSG424-mSp2 (1-112)****pSG424-mSp2 (113-224)****pSG424-mSp2 (228-339)****pSG424-mSp2 (337-448)**

Vektoren für die Expression von Fusionsproteinen aus Gal4-BD und N-terminalen Fragmenten des murinen Sp2. Unter Verwendung der in Tabelle 2.2.8.2 a aufgeführten Primer wurden die entsprechenden DNA-Fragmente amplifiziert und mit BamHI und XbaI geschnitten. Aus dem pSG424-Sp1A wurde das Sp1A-Fragment mit BamHI und XbaI entfernt und die vorbereiteten Sp2-Fragmente in den Vektor ligiert.

**pSG424-mSp2 (1-112) del1 (46-63)****pSG424-mSp2 (1-112) del2 (62-75)****pSG424-mSp2 (1-112) del3 (76-88)****pSG424-mSp2 (1-112) del4 (86-97)**

Expressionsvektoren für Gal4-Sp2 (1-112) Fusionsproteine mit internen Deletionen. Unter Verwendung von 5`phosphorylierten Primern und anschließender Ligation der linearen PCR-Produkte (vgl. 2.3.5 und Tabelle 2.2.8.2 b) wurden in Gal4-mSp2 (1-112) vier verschiedene Deletionen eingeführt. Deletion 1 (del1) umfasst die Aminosäuren 46-63, Deletion 2 (del2) Aminosäuren 62-75, Deletion 3 (del3) Aminosäuren 76-88 und Deletion 4 (del4) Aminosäuren 86-97.

---

## **Expressionsplasmide für Hefezellen**

### **pGBKT7-mSp2 (1-112)**

Expressionsplasmid für Gal4-BD-Sp2 (1-112). Als Template diente pN3-mSp2-3xFlag. Verwendet wurden die Primer mSp2fw1NcoI und mSp2rev112EagI. Das PCR-Produkt und der Vektor pGBKT7 wurden mit NcoI und EagI geschnitten und in eine Ligationsreaktion eingesetzt.

### **pGBKT7-mSp2 (337-448)**

Expressionsplasmid für Gal4-BD-Sp2 (1-112). Als Template diente pN3-mSp2-3xFlag. Verwendet wurden die Primer mSp2fw337NcoI und mSp2rev448EcoRI. Das PCR-Produkt und der Vektor pGBKT7 wurden mit NcoI und EcoRI geschnitten und in eine Ligationsreaktion eingesetzt.

### **pFBT9-mSp2 (1-112)**

### **pFBT9-mSp2 (337-448)**

Expressionsplasmide für Gal4-BD-Sp2 (1-112) und Gal4-Sp2 (337-448). Als Template diente pN3-mSp2-3xFlag. Verwendet wurden die Primer mSp2fw1EcoRI und mSp2rev112Sall bzw. mSp2fw337EcoRI und mSp2rev448Sall. Die PCR-Produkte und der Vektor pFBT9 wurden mit EcoRI und Sall geschnitten und in eine Ligationsreaktion eingesetzt.

## **2.2.8 Oligonukleotide**

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden bei den Firmen MWG Biotech oder Eurogentec bestellt. Oligonukleotide für Gelretardationsexperimente wurden als Einzelstrang-Oligonukleotide bestellt und vor der radioaktiven Markierung hybridisiert.

### 2.2.8.1 Primer für Genotypisierungen

Tabelle 2.2.8.1 a: Primer für Genotypisierungen

Name	Kurzname	Sequenz 5' - 3'
MSp2Ex/loxP3Seq3	P1	CCCTCTCAGAACTTTCAGATC
MSp2In2Seq4_rev	P2	CTTAGGAGGGATCTAGACTAG
Neo-Primer	P3	CATCGCCTTCTATCGGGTTGTTGA
Sp2 Exon4_fw	P4	ACCGAGAGCAAGTTCATGTC
mSp2Intron4_rev	P5	GCTATTGCTCTTGTCTTTAGC
Sp2In3/loxP3_fw	P6	TATCCCTGCGGATCCATAACT
Sp2Exon4_rev	P7	GGATACTTGCATTTGATCGGC
Cre 3'		CGATGCAACGAGTGATGAGGTTC
Cre 5'		GCACGTTCCACCGGCATCAAC

Tabelle 2.2.8.1 b: Amplikons

Allel	Primer	Länge Amplikon (bp)
Sp2wt	P1 + P2	760
Sp2wt	P1 + P5	457
Sp2lzn	P2 + P3	950
Sp2ko	P2 + P4	550
Sp2cko	P1 + P5	487
Sp2 Exon3/LoxP	P6 + P7	620
Cre	Cre 3' + Cre 5'	310

### 2.2.8.2 Primer für Klonierungen

Tabelle 2.2.8.2 a: Primer mit Restriktionsschnittstellen

Die Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Name	Sequenz 5' - 3'
mSp2fw356XhoI	TTGAA <u>ACTCGAG</u> CCGTACACCTTCTGGTGAGGT
mSp2fw379XhoI	TTGAA <u>ACTCGAG</u> ATCAACCGTCACCTGTAACAGC
mSp2fw400XhoI	TTGAA <u>ACTCGAG</u> ACATTCTAGCTGCCATTCTCCGA
mSp2aa448rBamHI	TTGAAAGGATCCGCACACCCTGGACTTGGACAC
mSp2fw1BamHI	TTGAAAGGATCCCAATGAGCGATCCACAGATGAG
mSp2fw113BamHI	TTGAAAGGATCCCTGCAATCCAGAACCCACCCCT
mSp2fw228BamHI	TTGAAAGGATCCCTGCTCAGCTCCTCACTGAGAG
mSp2fw337BamHI	TTGAAAGGATCCCGCCCTCTCAGAACTTTCAGAT
mSp2rev112XbaI	AATTAATCTAGAAAACACAACTGCCCTCCAG
mSp2rev224XbaI	AATTAATCTAGAAATATCGCTGGTGTTACCA
mSp2rev339XbaI	AATTAATCTAGACTGAGAGGGCTTCTGGGGGA
mSp2rev448XbaI	AATTAATCTAGACACACCCTGGACTTGGACAC
mSp2fw1NcoI	TTGAAACCATGGCAATGAGCGATCCACAGATGAG
mSp2rev112EagI	AATTAACGGCCGAAACACAACTGCCCTCCAG
mSp2fw337NcoI	TTGAAACCATGGCGCCCTCTCAGAACTTTCAGAT
mSp2rev448EcoRI	AATTAAGAATTCCACACCCTGGACTTGGACAC
mSp2fw1EcoRI	TTGAAAGAATTCTATGAGCGATCCACAGATGAGC
mSp2rev112Sall	AATTAAGTCGACAAACACAACTGCCCTCCAGG
mSp2fw337EcoRI	TTGAAAGAATTCCCTCTCAGAACTTTCAGATC
mSp2rev448Sall	AATTAAGTCGACCACACCCTGGACTTGGACACC

Tabelle 2.2.8.2 b: 5' phosphorylierte Primer zum Einfügen von Deletionen

Name	Sequenz 5' - 3'
mSp2del46rev	AATTTTGCTACATGTGCGCAGCAAG
mSp2del63fw	CCAAGGAAACTGGTCCCTATCAAA
mSp2del62rev	CTGGGGGGGAGCAGGAGGTGT
mSp2del75fw	CCTCTCAGTCCCTGCAAGAATAGC
mSp2del76rev	GAGAGGAGCGGGTTTGATAGGGAC
mSp2del88fw	TCTAAAGGAAATATACTTCAGATTGAGGGC

mSp2del86rev	GCTAAAGCTATTCTTGCAGGGGACTGAG
mSp2del97fw	GGCTCCCAGCTGAGTACCTCCTAC
mSp2del174rev	ATGACCAGATGTTGACGGGGTG
mSp2del192fw	GTGCAGAGCGGGGCCAAC
mSp2del397rev	GGTGCCACTCAGATGGGGAG
mSp2del417fw	GGGAGCATCATCAGCCTGAAC

### 2.2.8.3 Oligonukleotide für Gelretardationsexperimente

Tabelle 2.2.8.3: Oligonukleotide für Gelretardationsexperimente

Name	Sequenz 5' - 3'
GC-Box (upper)	GATCTCCGTTGGGGCGGGGCTTCACG
GC-Box (lower)	GATCCGTGAAGCCCCGCCCAACGGA
Gal4-C	GCTTAGCGGAGTACTGTCCTCCGAT
Gal4-D	GGGATCGGAGGACAGTACTCCGCTA

### 2.2.9 Antikörper und Antiseren

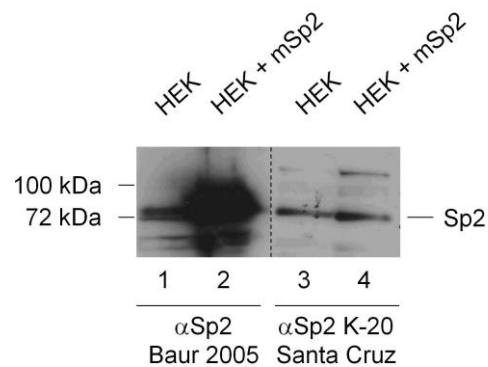
Eine Auflistung aller verwendeten Primärantikörper kann Tabelle 2.2.9 a entnommen werden. Die Antikörper wurden, soweit nicht anders angegeben, in der in Tabelle 2.2.9 a angegebenen Verdünnung eingesetzt.

Tabelle 2.2.9 a: Verwendete Primärantikörper

Name	Art der IgG	Quelle	Verdünnung	Firma	Referenz
$\alpha$ Sp1	polyklonal	Kaninchen	1:3000	Upstate	07-645
$\alpha$ Sp2 K-20	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz	sc-643
$\alpha$ Sp2	polyklonal, affinitätsgereinigt	Kaninchen	1:350		Baur 2005 Allweiss 2009
$\alpha$ Sp3 D-20	polyklonal	Kaninchen	1:2000	Santa Cruz	sc-644
$\alpha$ HA	monoklonal	Ratte	1:2000	Roche	11867423001
$\alpha$ Flag M2	monoklonal	Maus	1:3000	Sigma	F3165
$\alpha$ Gal4	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Babco	PRB-255C
$\alpha$ RACK1	monoklonal	Maus	1:1000	Santa Cruz	sc-17754

$\alpha$ E2F6 N-19	polyklonal	Ziege	1:500 1:1000	Santa Cruz	sc-8175
$\alpha$ RBBP4	polyklonal	Kaninchen	1:5000		Tyler et. al. (1996)

In Abbildung 2.2.9 ist ein Vergleich der beiden in Tabelle 2.2.9a aufgeführten  $\alpha$ Sp2-Antikörper dargestellt. Um die Spezifität der beiden zur Verfügung stehenden Antikörper zu testen, wurden HEK293 Zellen mit pCMVSPORT6-mSp2 transfiziert und jeweils 10  $\mu$ g Gesamtzellextrakt aus untransfizierten und transfizierten HEK293 Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Endogenes, humanes Sp2 sowie überexprimiertes, murines Sp2 wurden mit einem in diesem Labor hergestellten Antikörper (Baur 2005) oder einem kommerziell erhältlichen Antikörper ( $\alpha$ Sp2 K-20, Santa Cruz) detektiert. Beide Antikörper erkennen das endogene humane Sp2 (vgl. Spur 1 und 3). Der in diesem Labor hergestellte Antikörper erkennt ebenfalls das überexprimierte murine Sp2, während der kommerziell erhältliche Antikörper, entgegen der Herstellerangabe, nur humanes, nicht aber murines Sp2 detektiert (vgl. Spur 2 und 4).



**Abbildung 2.2.9: Vergleich von  $\alpha$ Sp2-Antikörpern.** HEK293 Zellen wurden mit pCMV-Sport6-mSp2 transfiziert und jeweils 10  $\mu$ g Zellextrakt aus transfizierten und nicht transfizierten Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die enthaltenen Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen und mit den angegebenen Antikörpern detektiert. Beide Antikörper erkennen endogenes, humanes Sp2 (vgl. Spur 1 und 3). Der in diesem Labor hergestellte Antikörper erkennt ebenfalls das überexprimierte murine Sp2, nicht aber der kommerziell erhältliche Antikörper (vgl. Spur 2 und 4).

Eine Auflistung aller verwendeten Sekundärantikörper kann Tabelle 2.2.9 b entnommen werden. Sekundäre Antikörper wurden für Immundetektionen mittels

Western Blot in einer Verdünnung von 1:20.000 eingesetzt. Sekundäre Antikörper mit Fluorophor wurden für die Immundetektion mittels Western Blot 1:10.000 und für Immunfluoreszenz 1:200 verdünnt.

Tabelle 2.2.9 b: Verwendete Sekundärantikörper

Name	Art der IgG	gekoppelt an	Quelle	Firma	Referenz
$\alpha$ Maus	polyklonal	Meerettichperoxidase	Schaf	Amersham	NA931
$\alpha$ Kaninchen	polyklonal	Meerettichperoxidase	Esel	Amersham	NA934
$\alpha$ Ratte	polyklonal	Meerettichperoxidase	Ziege	Amersham	NA935
$\alpha$ Ziege	polyklonal	Meerettichperoxidase	Esel	Promega	V8051
$\alpha$ Maus	polyklonal	Cy3	Ziege	Immuno Research	800-367- 5296
$\alpha$ Kaninchen	polyklonal	Alexa Fluor 594	Ziege	Molecular Probes	A-11012
$\alpha$ Ratte	polyklonal	IRDye 680	Ziege	Li-Cor	926-32229

### 2.2.10 Inzucht-Mausstamm und Mauslinien

Als Tiermodell diente im Rahmen dieser Arbeit die Hausmaus (*Mus musculus*). Als Wildtyp-Mauslinie wurde der Inzuchtstamm C57Bl/6N eingesetzt (bezogen von Harlan). Inzuchtstämme zeichnen sich dadurch aus, dass alle Tiere eines Stammes genetisch identisch und somit für alle Allele homozygot sind. Inzuchtstämme bieten daher einen definierten und, von spontanen Mutationen abgesehen, konstanten genetischen Hintergrund für Mausanalysen (Festing, 1989).

Die MeuCre40 Linie (Leneuve et al., 2003) wurde freundlicherweise von Martin Holzenberger zur Verfügung gestellt. Diese Mauslinie ist heterozygot für Cre-Rekombinase, die im Embryo im Morula- und Blastozystenstadium exprimiert wird. Sie basiert ebenfalls auf dem C57Bl/6-Hintergrund.

Des Weiteren wurden die Sp2lzn-Linie und die daraus hergestellten Linien Sp2ko und Sp2cko verwendet. Die Erhaltung einer Linie erfolgte immer durch Kreuzung heterozygoter Tiere (Sp2wt/lzn, Sp2wt/ko, Sp2wt/cko) mit der Wildtyp-Linie C57Bl/6N. Wurden für ein Experiment homozygote Tiere benötigt, wurden diese durch das Kreuzen von heterozygoten Mäusen erhalten.

---

## **2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1 Standardmethoden der Molekularbiologie**

Alle Standardmethoden der Molekularbiologie, wie die Fällung von Nukleinsäuren, präparativer und analytischer Restriktionsverdau, Agarose-Gelelektrophorese, Ligation von DNA-Fragmenten, Transformation von Bakterien usw. wurden nach Standardprotokollen durchgeführt und können der Literatur entnommen werden (Sambrook und Russel 2001).

### **2.3.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten für die Ligation**

DNA-Fragmente für Ligationen wurden entweder durch präparativen Restriktionsverdau von Plasmid-DNA oder durch Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) hergestellt. Im Anschluss an einen Restriktionsverdau wurden die Restriktionsansätze über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt und die DNA-Fragmente aus dem Gel isoliert. Die anschließende Aufreinigung der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) wie vom Hersteller angegeben. Die Elution erfolgte mit 30 µl 2/0,2 TE.

PCR-Produkte wurden zunächst mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt, einem Restriktionsverdau unterzogen und dann über ein präparatives Gel aufgereinigt (s.o.). Menge und Qualität der so erhaltenen DNA wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft und die DNA-Fragmente anschließend für Ligationen eingesetzt.

### **2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA**

Für Transformationen von Plasmid-DNA wurden ultrakompetente NEB5 $\alpha$  (New England Biolabs) nach Herstellerangaben verwendet. Für analytische Plasmidpräparationen basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse wurden die Puffer des Nucleobond AX-Systems verwendet. Dazu wurden 1,5 ml einer Übernacht-Kultur für 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert und das Bakterienpellet nach Verwerfen des Überstandes in 100 µl Puffer S1 resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 100 µl Puffer S2 und fünfminütige Inkubation



bei Raumtemperatur. Anschließend wurden zur Neutralisation der Reaktion und Ausfällung von bakteriellen Proteinen 100 µl Puffer S3 zugegeben und der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Zur vollständigen Entfernung des Präzipitats wurde zwei Mal für je 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert, wobei der Überstand jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 450 µl Isopropanol und Inkubation bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für mindestens 30 min gefällt, durch Zentrifugation für 30 min bei 13000 Upm präzipitiert und noch zwei Mal mit 75% Ethanol gewaschen. Nach der Trocknung der DNA wurde diese in 50 µl 10/1 TE gelöst und konnte dann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA im quantitativen Maßstab erfolgte ebenfalls mit dem Nucleobond AX-System. Hierzu wurden die in 500 ml Übernachtskultur enthaltenen Bakterienzellen durch Zentrifugation bei 4000 Upm und  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 min pelletiert. Die weitere Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, mit der Änderung, dass die Volumina der Puffer S1, S2 und S3 von 12 ml auf 24 ml erhöht wurden, um die Effizienz der Lyse zu erhöhen. Je nach Größe wurde das erhaltene DNA-Pellet am Ende in 200-500 µl 10/1 TE aufgenommen. Menge und Qualität der DNA wurden photometrisch (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific) und mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

Material:

Nukleobond AX System

10/1 TE

Isopropanol

70% Ethanol

#### **2.3.4 Herstellung von DNA-Fragmenten für Klonierungen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Mittels PCR wurden DNA-Fragmente für Restriktionsverdaus und anschließende Ligation in Zielvektoren hergestellt. Um die Fehlerrate der PCR möglichst gering zu halten, wurde eine sogenannte *Proofreading* Polymerase verwendet, die den fehlerhaften Einbau von Nukleotiden wieder korrigieren kann. Verwendet wurde die Phusion High Fidelity Polymerase (Finnzymes). Als Template dienten Plasmide mit der zu amplifizierenden cDNA. Ein 50 µl Reaktionsansatz bestand aus 10 µl Phusion HF Puffer, 1 µl 10 mM dNTP-Mix (2,5 mM pro Nukleotid, Fermentas), 25 pmol von

jedem Primer (vgl. Tabelle 2.2.8.2a), 1 U Phusion Polymerase, 10 ng Plasmid-DNA und nukleasefreiem Wasser. Die PCR wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung	2 min	98°C
2. Denaturierung	10 s	98°C
3. Primeranlagerung	15 s	60-72°C
4. Verlängerung	15-30 s/kb	72°C
5. Finale Verlängerung	7 min	72°C
6. Kühlen	∞	4°C

Die Schritte 2 bis 4 wurden insgesamt 30 Mal durchgeführt. Die optimale Temperatur für die Anlagerung der Primer war abhängig von den individuellen Schmelztemperaturen, die Dauer der Verlängerungsreaktion von der Größe des zu amplifizierenden Fragments. Die PCR-Produkte wurden anschließend im Agarose-Gel aufgetrennt und analysiert, aufgereinigt (vgl. 2.3.2), mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und in den Zielvektor ligiert.

### 2.3.5 Einführung von Deletionen in Plasmid-DNA mittels PCR

Zur Einführung von Deletionen in bereits bestehende Vektoren wurden 5'-phosphorylierte Primer (siehe Tabelle 2.2.8.2b) verwendet. Diese wurden so ausgewählt, dass sie beiderseits des zu deletierenden Bereiches lagen. Verwendet wurde die Phusion High Fidelity Polymerase (Finnzymes). Die PCR wurde wie in 2.3.4 beschrieben durchgeführt. Auf diese Weise entstand ein 5'-phosphoryliertes, lineares PCR-Produkt, welches das gesamte Plasmid ohne den zu deletierenden Bereich umfasste. Im Anschluss an die PCR wurde das PCR-Produkt aufgereinigt (vgl. 2.3.2) und in eine Ligationsreaktion eingesetzt. Schließlich erfolgte die Transformation in *E. coli* (NEB5 $\alpha$ , New England Biolabs) mit anschließender Präparation der Plasmid-DNA (vgl. 2.3.3).

### 2.3.6 Genotypisierung mittels PCR

Zur Genotypisierung von Mäusen, Mausembryonen oder murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) wurde das REDExtract-Amp Tissue PCR Kit (Sigma) verwendet.

Zunächst wurde genomische DNA aus Gewebeproben extrahiert. Dazu wurden 1-2 Wochen alten Mäusen wenige Millimeter der Schwanzspitze abgeschnitten. Bei Embryonen an Tag 13,5 wurde ebenfalls die Schwanzspitze verwendet, bei Embryonen an Tag 8,5 oder 9,5 die Fruchtblase. Sollten MEFs genotypisiert werden, wurde beim Umsetzen der Zellen eine kleine Menge der von der Kulturschale abgelösten Zellen entnommen und für 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1x PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zell- oder Gewebeprobe wurde dann in einem Reaktionsgefäß mit 100 µl Extraction Solution und 25 µl Tissue Preparation Solution versetzt. Die Inkubation erfolgte zuerst für 10 min bei Raumtemperatur und anschließend für 3 min bei 95°C. Nach Zugabe von 100 µl Neutralization Solution und gründlichem Mischen konnte die extrahierte DNA direkt für eine PCR verwendet oder bei –20°C gelagert werden. Je nach zu untersuchendem Allel wurden pro Reaktion jeweils 15 pmol der entsprechenden Primer eingesetzt (siehe Tabelle 2.2.8.1a). Ein PCR-Ansatz bestand aus 10 µl REDExtrakt-N-Amp PCR 2x Reaction Mix, 15 pmol pro Primer, 4 µl Template und nukleasefreiem Wasser ad 20 µl. Verwendet wurde das folgende PCR-Programm:

1. Initiale Denaturierung	3 min	94°C
2. Denaturierung	30 s	94°C
3. Primeranlagerung	30 s	58°C
4. Verlängerung	1 min	72°C
5. Finale Verlängerung	8 min	72°C
6. Kühlen	∞	4°C

Die Schritte 2 bis 4 wurden insgesamt 30 Mal durchgeführt. Im Anschluss an die PCR konnten 6 µl der Reaktion direkt auf ein Agarose-Gel aufgetragen und analysiert werden. Die Größe der Amplikons für die einzelnen Allele kann Tabelle 2.2.8.1 b entnommen werden.

### 2.3.7 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Für Gelretardationsexperimente wurden doppelsträngige Oligonukleotide benötigt. Diese waren durch Hybridisierung zweier komplementärer einzelsträngiger Oligonukleotide (vgl. Tabelle 2.2.8.3) und anschließende Aufreinigung mittels

Polyacrylamidgel hergestellt worden (Baur 2005) und standen zur radioaktiven Markierung zur Verfügung. Dabei wurden die 5'-Überhänge des doppelsträngigen Oligonukleotids durch Klenow-Enzym mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP und nicht-radioaktivem dATP, dGTP und dTTP aufgefüllt.

Eine Markierungsreaktion bestand aus 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l 10x Markierungspuffer, 2,5  $\mu$ l dATP (2,5 mM), 2,5  $\mu$ l dTTP (2,5 mM), 2,5  $\mu$ l dGTP (2,5 mM), 10  $\mu$ l [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP (3000 Ci/mmol; entspricht 100  $\mu$ Ci), 5  $\mu$ l Doppelstrang-Oligonukleotid (10 ng/ $\mu$ l) und 2,5  $\mu$ l Klenow-Enzym (2 U/ $\mu$ l). Die Inkubation erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt und die Oligonukleotide mittels Sephadex G-50 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) nach Herstellerangaben von nicht eingebauten radioaktiven und nicht-radioaktiven Nukleotiden getrennt. Die radioaktiven Zerfälle pro Minute (*counts per minute*, cpm) in 1  $\mu$ l Oligonukleotid wurden in einem Szintillationszähler (LS1701, Beckman) gemessen.

#### Material:

[ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP (3000 Ci/mmol) (Hartmann Analytic)

10x Markierungspuffer	500 mM	Tris/Cl pH 7,5
	100 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	DTT
	0,5 mg/ml	BSA

dATP, dGTP, dTTP (Amersham)

Klenow Enzym (Labeling grade, Roche)

---

## **2.4 Biochemische Methoden**

### **2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry eignet sich für Extrakte, die Detergenzien enthalten, wie SDS-Gesamtzellextrakte (vgl. 2.4.11). Verwendet wurde das Biorad DC Protein Assay. Zunächst wurde aus 1 ml Lösung A und 20 µl Lösung S eine Arbeitslösung hergestellt und davon jeweils 100 µl mit 20 µl Proteinextrakt oder BSA-Standardlösung gemischt. Dann wurden 800 µl Lösung B zu jeder Probe gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption jeder Probe im Photometer bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen und anhand der BSA-Standardreihe die Proteinkonzentration jeder Probe bestimmt.

Material:

BSA-Standardreihe (0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,6 mg/ml; 0,8 mg/ml; 1 mg/ml)

Biorad DC Protein Assay

### **2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau in saurer Lösung durch die Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm verschiebt, sodass die Absorption bei 595 nm im linearen Bereich proportional zur Proteinkonzentration ist. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden jeweils 5 µl Proteinextrakt oder BSA-Standardreihe mit 500 µl 1x Bradford Reagenz gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben in eine Mikrotiterplatte überführt und die Absorption bei 595 nm in einem Plattenphotometer gemessen. Anhand der erstellten Standardgeraden konnte die Proteinkonzentration jeder Probe bestimmt werden.

Material:

BSA-Standardreihe (0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,6 mg/ml; 0,8 mg/ml; 1 mg/ml)

Biorad 5x Bradford Reagenz

### 2.4.3 Herstellung von SDS-Gesamtzellextrakten

Gesamtzellextrakte aus HEK-, MEF- und SL2-Zellen wurden unter denaturierenden Bedingungen hergestellt. Die Zellen wurden in 10 cm-Kulturschalen möglichst bis zur Konfluenz wachsen gelassen oder etwa 42 Stunden nach einer Transfektion geerntet. Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen. Nach der Zugabe von 300 µl SDS-Lysispuffer und zweiminütiger Inkubation wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Extrakte wurden für 10 min im Wasserbad aufgeköcht und unlösliche Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei –80°C gelagert. Die Proteinkonzentration konnte dann mittels Biorad DC Protein Assay bestimmt werden.

Material:

PBS

Lysispuffer:                      Lysispuffer 1 und 2 im Verhältnis 1:2  
    0,2 mM PMSF  
    5 mM DTT  
    0,5 x Proteaseinhibitor-Cocktail (PIC)

Lysispuffer 1	150 mM	Tris/Cl pH 6,7
	5%	SDS
	30%	Glycerin
Lysispuffer 2	25 mM	Tris/Cl pH 8,2
	50 mM	NaCl
	0,5%	NP-40
	0,1%	SDS
	0,1%	Natriumazid

### 2.4.4 Herstellung von Kernextrakten mit physiologischer Salzkonzentration

Für Größenfraktionierungen mittels Superose 6 Säule (vgl. 2.4.13) wurden Kernextrakte mit physiologischer Salzkonzentration (150 mM NaCl) hergestellt. HEK-

oder HEK-mSp2-3xFlag Zellen wurden auf 15 cm Zellkulturschalen ausplattiert. Die Zellen wurden gegebenenfalls am nächsten Tag transfiziert und 42 Stunden später geerntet oder bis zur Konfluenz inkubiert, wenn keine Transfektion durchgeführt wurde. Die Ernte der Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS durch Zugabe von 5 ml 1x PBS und Abschaben der Zellen von der Kulturschale. Die Zellen wurden dann für 5 min bei 1000 Upm und 4°C zentrifugiert und das Pellet nach Verwerfen des Überstandes in 2 ml Puffer 1 resuspendiert. Aufgrund der niedrigen Salzkonzentration in diesem Puffer quollen die Zellen auf und konnten dann mittels Pistille aufgebrochen werden. Zur Entfernung des Zytosols wurden die Proben dann für 5 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Volumen der pelletierten Zellkerne wurde abgeschätzt und das gleiche Volumen Lysispuffer zugegeben. Die Zellkerne wurden resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und mit Benzonase (4 U/ml) versetzt. Nach dem Benzonase-Verdau (2 Stunden bei 10°C) wurden die Kernextrakte für 15 min bei 4°C und 13000 Upm zentrifugiert und die Überstände in frische Reaktionsgefäße überführt. Anschließend konnte eine Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford durchgeführt werden.

#### Material:

##### PBS

Puffer 1	10 mM	HEPES pH 7,6
	10 mM	NaCl
	3 mM	MgCl <sub>2</sub>

##### Lysispuffer

50 mM	Tris/Cl pH 8,0
150 mM	NaCl
2 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	EDTA
0,5% (v/v)	NP-40
0,5 mM	DTT
1 mM	PMSF
0,5x	PIC

### 2.4.5 Herstellung von Hochsalz-Kernextrakten

Für Größenfraktionierungen und EMSAs wurden Kernextrakte unter nativen Bedingungen und mit erhöhter Salzkonzentration (420 mM NaCl) hergestellt. Die Zellen wurden zunächst zwei Mal mit 1x PBS gewaschen und in 1x PBS von der Schale geschabt. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C für 1 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 750 µl (10 cm Kulturschalen) oder 2 ml (15 cm Kulturschalen) Puffer B resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Aufgrund der niedrigen Salzkonzentration bewirkt dieser Puffer das Anschwellen und Aufplatzen der Zellen. Die Proben wurden dann für 1 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Volumen der pelletierten Zellkerne wurde abgeschätzt und diese im gleichen Volumen Puffer C resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden unlösliche Zellkerntrümmer durch Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C für 10 min sedimentiert und die Überstände in frische Reaktionsgefäße überführt. Die Kernextrakte wurden dann bei –80°C gelagert. Es konnte eine Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford durchgeführt werden.

Wo angegeben, wurden den Puffern B und C RNase A (10 µg/ml; Sigma) oder RNase Inhibitor (200 U/ml, Qiagen) zugegeben. Die Inkubation mit Puffer B erfolgte dann für 10 min bei Raumtemperatur statt auf Eis.

Material:

1x PBS

Puffer B	10 mM	HEPES pH 7,9
	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	KCl
	0,2 mM	PMSF
	0,5x	PIC
Puffer C	20 mM	HEPES pH 7,9
	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	420 mM	NaCl
	0,2 mM	EDTA
	25% (v/v)	Glyzerin
	0,2 mM	PMSF
	0,5x	PIC



#### **2.4.6 Aufreinigung von Proteinen über einen Flag-Tag für Massenspektrometrie**

Für die Aufreinigung von Proteinen über einen Flag-Tag wurde eine Agarose verwendet, an die der  $\alpha$ Flag Antikörper M2 kovalent gekoppelt ist (Sigma). Zunächst wurden Gesamtzellextrakte unter nativen Bedingungen hergestellt. Dazu wurde das Protokoll nach Herstellerangaben leicht abgeändert. HEK- und HEK-mSp2-3xFlag Zellen wurden auf jeweils 15 Zellkulturschalen (Durchmesser 15 cm) ausplattiert und bis zur Konfluenz inkubiert. Vor der Lyse der Zellen wurden diese zwei Mal mit 1x PBS gewaschen. Dann wurde pro Schale 1 ml Lysispuffer zugegeben und die Zellen bei 4°C für 15-30 min schwenkend lysiert. Anschließend wurden die Extrakte in 50 ml Röhrchen überführt und die unlöslichen Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 1000 Upm und 4°C für 10 min pelletiert. Gegebenenfalls wurde nun ein Benzonase-Verdau durchgeführt, um die im Extrakt enthaltenen Nukleinsäuren abzubauen. Dazu wurden pro ml Extrakt 4 U Benzonase zugegeben und für 2 Stunden bei 10°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation. Pro Ansatz ergab sich ein Gesamtvolumen von etwa 22 ml Zellextrakt. Zur Entfernung von Proteinen, die unspezifisch an die  $\alpha$ Flag-Agarose binden, wurden die Extrakte für 1 Stunde bei 4°C rotierend mit 300  $\mu$ l Protein A Sepharose (Bettvolumen pro Ansatz) inkubiert. Die Sepharose war zuvor drei Mal mit TBS gewaschen und schließlich mit Lysispuffer äquilibriert worden. Die Vorbereitung von 300  $\mu$ l  $\alpha$ Flag-Agarose (Bettvolumen pro Ansatz) erfolgte analog. Zur Entfernung der Sepharose wurden die Extrakte für 5 min bei 1000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand auf die vorbereitete  $\alpha$ Flag-Agarose gegeben. Die Inkubation erfolgte rotierend für 2 Stunden bei 4°C. Danach wurde für 5 min bei 1000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurde drei Mal mit je 15 ml TBS/1% TritonX-100 gewaschen, wobei die Proben im ersten Waschschrift in 15 ml-Röhrchen überführt wurden, um die Sedimentation der Matrix zu erleichtern. Anschließend wurde zwei Mal mit je 15 ml TBS/0,05% NP-40 gewaschen und die Proben im letzten Waschschrift in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zur Elution der an  $\alpha$ Flag-Antikörper gebundenen Proteine wurden pro Ansatz 300  $\mu$ l Elutionspuffer zugegeben und für 30 min leicht schüttelnd bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Proben für 1 min bei 2000 Upm zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Zentrifugation wiederholt, um die Agarose komplett zu entfernen. Die Proben wurden dann bei -80°C gelagert und die Elution bis zu vier Mal wiederholt.

---

Material:

TBS

TBS/1% TritonX-100

TBS/0,05% NP-40

TBS/0,1% NP-40

$\alpha$ Flag-Agarose (Sigma)

3xFlag-Peptid (MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK; PSL GmbH, Heidelberg)

Lysispuffer	50 mM	Tris/Cl pH 7,4
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	2 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1%	TritonX-100
	0,5x	PIC
	1 mM	PMSF
Elutionspuffer	1 ml	TBS/0,1% NP-40
	30 $\mu$ l	3xFlag Peptid (5 $\mu$ g/ $\mu$ l)

#### 2.4.7 Aufreinigung von Proteinen über einen Flag-Tag für EMSA

Zur Verwendung in EMSAs wurden Proteine mit HA-Flag Epitop in SL2-Zellen exprimiert, ein Gesamtzellextrakt hergestellt, Proteine mit HA-Flag Epitop an die  $\alpha$ Flag-Agarose gekoppelt und aufgereinigt. Dazu wurden pro 15 cm-Kulturschale  $3\text{-}4 \cdot 10^7$  SL2-Zellen ausplattiert, am nächsten Tag mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert und 42 Stunden später geerntet. Vor der Zugabe von 1 ml Lysispuffer wurden die Zellen zwei Mal mit 1x PBS gewaschen. Die Lyse erfolgte schwenkend bei 4°C für 15-30 min. Anschließend wurde das Lysat abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und 4 U/ml Benzonase zugegeben. Nach Inkubation bei 10°C für 2 Stunden wurden die Proben für 15 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand zur vorbereiteten Protein G Sepharose gegeben (vgl. 2.4.12, Bettvolumen 40  $\mu$ l). Die Proben wurden bei 4°C für 1 Stunde rotiert und anschließend bei 2000 Upm für 2 min zentrifugiert. Der so vorgereinigte Überstand wurde zur vorbereiteten  $\alpha$ Flag-Agarose (Bettvolumen 40  $\mu$ l) gegeben und für 1 Stunde bei 4°C rotiert. Um den Überstand entfernen zu können, wurden die

Proben bei 2000 Upm für 2 min zentrifugiert. Nach Zugabe von 1 ml Waschpuffer 1 wurden die Proben in ein 15 ml Röhrchen überführt und insgesamt drei Mal mit jeweils 15 ml Waschpuffer 1 für 5 min rotierend bei 4°C gewaschen. Zwischendurch wurden die Proben bei 1000 Upm und 4°C für je 5 min zentrifugiert und der Waschpuffer entfernt. Es folgten drei Waschschrte mit Waschpuffer 2, anschließend wurden die Proben in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt, der restliche Waschpuffer entfernt und 100 µl Elutionspuffer zugegeben. Die Elution erfolgte leicht schwenkend für 30 min bei 4°C. Der Überstand wurde dann durch zweimaliges Zentrifugieren bei 2000 Upm und 4°C für je 2 min von der  $\alpha$ Flag-Agarose getrennt und nach Zugabe von 4µl DTT (0,1 M) bei –80°C gelagert.

Wo angegeben, wurden HA-Flag-Sp Fusionsproteine vor der Elution mit 1 U alkalischer Phosphatase (Roche) in 20 µl 1x Dephosphorylierungspuffer (Roche) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Phosphatase-Inhibitor Cocktail (PhosSTOP, Roche) wurde, wo angegeben, dem Lysispuffer zugesetzt (1 Tablette pro 10 ml). Zur Stabilisierung der Zinkfinger wurde allen Puffern 1 µm Zinksulfat zugegeben.

#### Material:

1x PBS

$\alpha$ Flag-Agarose (Sigma)

3xFlag-Peptid (MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK; PSL GmbH, Heidelberg)

Lysispuffer	50 mM	Tris/Cl pH 7,4
	150 mM	NaCl
	1%	TritonX-100
	2 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 µM	ZnSO <sub>4</sub>
	1,6 x	PIC
	1 mM	PMSF

Waschpuffer 1	50 mM	Tris/Cl pH 7,4
	800 mM	NaCl
	0,1%	NP-40
	1 µM	ZnSO <sub>4</sub>

---

Waschpuffer 2	50 mM	Tris/Cl pH 7,4
	420 mM	NaCl
	0,05%	NP-40
	1 $\mu$ M	ZnSO <sub>4</sub>
Elutionspuffer	960 $\mu$ l	Waschpuffer 2
	10 $\mu$ l	BSA (100 $\mu$ g/ $\mu$ l)
	30 $\mu$ l	3xFlag-Peptid (5 $\mu$ g/ $\mu$ l)

### 2.4.8 Co-Immunpräzipitation

Das Prinzip einer Co-Immunpräzipitation beruht darauf, dass man mit einem spezifischen Antikörper ein zu untersuchendes Protein präzipitiert und dann im Western Blot einen potentiellen Interaktionspartner dieses Proteins nachweist. HEK293 Zellen (10 cm Kulturschalen) wurden gegebenenfalls mit Expressionsplasmiden transfiziert (vgl. 2.5.8). Die Zellen wurden vor der Ernte zwei Mal mit 1x PBS gewaschen und dann bei 4°C für 15 min in 1 ml Lysispuffer lysiert. Die Extrakte wurden mit 4 U/ml Benzonase für 2 Stunden bei 10°C inkubiert und anschließend für 15 min bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Für die Präzipitation wurde entweder  $\alpha$ Flag-Agarose oder mit Antikörper gekoppelte Protein A oder G Sepharose verwendet. Die Agarose bzw. Sepharose (Bettvolumen 25  $\mu$ l) wurde dreimal in 1x TBS gewaschen und mit Lysispuffer äquilibriert. Protein A oder G Sepharose wurde dann für 1 Stunde bei 4°C rotierend mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Extrakte zugegeben und für 1 Stunde bei 4°C rotiert. Um den Überstand entfernen zu können, folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 2000 Upm für 2 min. Danach wurde die Agarose bzw. Sepharose fünf Mal mit je 1 ml 1x TBS/0,1% NP-40 gewaschen und in 25  $\mu$ l 2x Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Proben konnten anschließend mittels Western Blot analysiert werden.

Material:

1x PBS

1x TBS

1x TBS/0,1% NP-40

$\alpha$ Flag Agarose (Sigma)

Protein A Sepharose (GE Healthcare)

Protein G Sepharose (GE Healthcare)

Lysispuffer	50 mM	Tris/Cl pH 7,4
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	2 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1%	TritonX-100
	0,5x	PIC
	1 mM	PMSF

#### 2.4.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine unter denaturierenden Bedingungen anhand ihres Molekulargewichts und unabhängig von ihrer individuellen Ladung aufgetrennt werden. Verwendet wurde das Mini-Protean Tetra Cell System (Biorad). Abhängig vom Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine wurden Trenngele mit einer Acrylamid-Konzentration von 6%, 8%, 10% oder 12% verwendet (siehe Tabelle 2.4.8), während die Acrylamid-Konzentration im Sammelgel immer 5% betrug. Die Proteinproben wurden mit 2x Laemmli-Puffer gemischt, durch fünfminütiges Aufkochen denaturiert und in die Taschen des Sammelgels gegeben. Als Größenstandard wurde Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 200V in 1x SDS-Laufpuffer durchgeführt. Im Anschluss wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel zur weiteren Analyse mittels Coomassie Brilliant Blau Färbung, Silberfärbung oder Western Blot verwendet.

Material:

30% Acrylamidlösung	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	
Sammelgelpuffer	1 M Tris/Cl pH 6,8	
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/Cl pH 8,8	
10% (w/v) SDS		
10% (w/v) APS		
TEMED		
1x SDS-Laufpuffer	25 mM	Tris/Cl pH 8,3
	250 mM	Glyzerin

	0,1% (w/v)	SDS
2x Laemmli-Puffer (Sigma)	100 mM	Tris/Cl pH 6,8
	4% (w/v)	SDS
	0,0001% (w/v)	Bromphenolblau
	20% (v/v)	Glyzerin
	5% (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol

Tabelle 2.4.9: Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamid Gelen

Komponente	Einheit	Trenngel				Sammelgel
		6%	8%	10%	12%	
Trenngelpuffer	ml	1,86	1,86	1,86	1,86	
Sammelgelpuffer	ml					0,625
30% Acrylamidlösung	ml	1,5	2,0	2,5	3,0	0,544
H <sub>2</sub> O	ml	3,98	3,48	2,98	2,48	1,44
10% SDS	$\mu$ l	75	75	75	75	25
10% APS	$\mu$ l	75	75	75	75	25
TEMED	$\mu$ l	10	10	10	10	2,5
<b>Summe</b>	<b>ml</b>	<b>7,5</b>	<b>7,5</b>	<b>7,5</b>	<b>7,5</b>	<b>2,7</b>

#### 2.4.10 Coomassie Brilliant Blau Färbung

Zur Anfärbung von Proteinen im SDS-Polyacrylamid-Gel wurde die Roti-Blue Färbelösung (Roth) verwendet. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel in die Färbelösung überführt und über Nacht bei Raumtemperatur darin geschwenkt. Am nächsten Tag wurde das Gel mit destilliertem Wasser entfärbt, so dass nur noch die Proteinbanden sichtbar waren. Dann wurde das Gel zur Dokumentation eingescannt und anschließend auf Whatman Papier im Gelrockner bei 80°C getrocknet.

Material:

Roti-Blue Färbelösung                      20% (v/v) Roti-Blue 5x Farbstoffkonzentrat

20% (v/v) Methanol

60% (v/v) H<sub>2</sub>O

### 2.4.11 Silberfärbung von Proteingelen

Eine sensitivere Methode als die Coomassie Brilliant Blau Färbung, um Proteinbanden in Polyacrylamid-Gelen sichtbar zu machen, ist die Färbung mit Silbernitrat. Verwendet wurden Gele, die zunächst mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt und anschließend entfärbt worden waren (vgl. 2.4.9). Von allen angegebenen Lösungen wurden pro Gel 50 ml verwendet. Ein Gel wurde zunächst zwei Mal für je 60 min in Fixierlösung inkubiert. Die Sensibilisierung erfolgte für 30-60 min unter leichtem Schwenken in Sensibilisierungslösung. Anschließend wurde das Gel vier Mal für je 5 min in destilliertem Wasser gewaschen und für 20 min unter Schwenken in Dunkelheit mit Silberlösung gefärbt. Nach zweimaligem Waschen in destilliertem Wasser erfolgte die Entwicklung durch Schwenken in Entwicklerlösung für 0,5-4 min, bis die gewünschte Intensität erreicht worden war. Dann wurde die Reaktion beendet durch Abgießen der Entwicklerlösung und Inkubation in Stopplösung für 10 min. Zum Schluss wurde das Gel noch drei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen und konnte dann eingescannt und getrocknet oder in Aufbewahrungslösung bei 4°C gelagert werden.

#### Material:

Fixierlösung	10% (v/v)	Essigsäure
	40% (v/v)	Ethanol
Sensibilisierungslösung	30% (v/v)	Ethanol
	2 g/l	Natriumthiosulfat (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> *5 H <sub>2</sub> O)
	68 g/l	Natriumacetat (CH <sub>3</sub> COONa)
Silberlösung	0,25 g/l	Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )
Entwicklerlösung	2,5 g/l	Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )
	400 µl/l	37% Formaldehyd
Stopplösung	14,6 g/l	EDTA x 2 H <sub>2</sub> O 2Na

---

Aufbewahrungslösung	1% (v/v)	Essigsäure
	15% (v/v)	Ethanol

#### 2.4.12 Western Blot und Immundetektion

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen in einem Proteinextrakt wurde ein Western Blot mit anschließender Immundetektion durchgeführt. Dazu wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine zunächst vom Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde das Mini-Protean Tetra Cell System (Biorad) verwendet. Der Transfer erfolgte nach Standardprotokollen in Transferpuffer für 2 Stunden bei 350 mA oder über Nacht bei 90 mA. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran dann in Blockierungslösung überführt und bei Raumtemperatur für 1 Stunde oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal in TBST gewaschen und für 1 Stunde schwenkend bei Raumtemperatur in 10 ml Antikörperlösung, die den Primärantikörper enthielt, inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit TBST folgte analog die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Dann wurde die Membran vier Mal mit TBST gewaschen, der Waschpuffer gründlich entfernt und die Membran für 5 min mit 1 ml ECL-Lösung (Immobilon HRP-Substrate Detection Kit, Millipore) inkubiert. Diese Lösung enthält ein Substrat für die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerettichperoxidase, durch deren Aktivität ein Lichtsignal entsteht, das dann mit einem Röntgenfilm detektiert werden kann.

Um anschließend andere Antikörper zum Nachweis spezifischer Proteine auf einer Membran verwenden zu können, mussten zunächst gebundene Primär- und Sekundärantikörper entfernt werden. Dazu wurde die Membran mit 5 ml Restore Western Stripping Buffer (Thermo Scientific) für 15-30 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde die Membran gründlich in TBST gewaschen und die Detektion wie oben beschrieben erneut durchgeführt.

Anstelle von mit Meerettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörpern, konnten auch Sekundärantikörper mit Fluorophor verwendet werden. In dem Fall wurde eine Immobilon-FL PVDF-Membran verwendet. Außerdem wurde die Membran nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper zur Entfernung des Tween 20 in TBS gewaschen. Zur Detektion der Fluoreszenz-Signale wurde ein Licor Odyssey Infrarotscanner verwendet.



**Material:**

Immobilon-P Transfer Membran (Millipore)

Immobilon-FL Transfer Membran (Millipore)

Transferpuffer	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,05% (w/v)	SDS
	20% (v/v)	Methanol
TBST	20 mM	Tris/Cl pH 7,6
	150 mM	NaCl
	0,1% (v/v)	Tween 20
Blockierungslösung	TBST/5% (w/v) Magermilchpulver	
Antikörperlösung	TBST/1% (w/v) Magermilchpulver	
Restore Western Stripping Buffer (Thermo Scientific)		

**2.4.13 Größenfraktionierung mittels Superose 6 Säule**

Die Gelchromatographie ermöglicht es, ein Proteingemisch unter nativen Bedingungen so zu fraktionieren, dass Protein-Protein Interaktionen erhalten bleiben. Je größer ein Protein oder Proteinkomplex ist, desto schneller durchläuft das Protein oder der Komplex die Säule, während kleinere Proteine oder Proteinkomplexe durch Poren im Säulenmaterial gebremst werden. Durch Eichung der Säule mit Proteinen bekannter Größe kann den Fraktionen ein Molekulargewicht zugeordnet werden.

Um ein Verstopfen der Säule zu verhindern, wurden alle Lösungen und Puffer vor ihrer Verwendung steril filtriert, um eventuell vorhandene Partikel zu entfernen. Alle Puffer und Lösungen wurden kalt (4°C) verwendet. Für die Chromatographie wurde eine Superose 6 10/300 GL Säule (GE Healthcare, Säulenvolumen 24 ml) im Kühlraum (4°C) an einen Äktapurifier (GE Healthcare) angeschlossen, die Steuerung erfolgte über die Unicorn Software (GE Healthcare). Vor dem Einbau der Säule mussten zunächst die Pumpen und Schläuche des Äktapurifiers mit dem Chromatographiepuffer gespült werden (Flussrate 1 ml/min, 10-15 min). Danach wurde die in 20% Ethanol gelagerte Säule unter Fluss (0,1 ml/min) angeschlossen und vor dem Beginn der Chromatographie mit zwei Säulenvolumen Chromatographiepuffer gewaschen. Für Chromatographien wurden jeweils 100 µl

Kernextrakt (150 mM NaCl) mit einer Proteinkonzentration von etwa 8 µg/µl verwendet. Dieser wurde direkt vor der Beladung der Säule für 5 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert, um eventuell vorhandene Präzipitate zu entfernen. Die Fraktionierung erfolgte mit Chromatographiepuffer bei einer Flussrate von 0,2 ml/min und einem Druck von etwa 0,8 MPa. Aufgefangen wurden im angeschlossenen Fraktionssammler 0,5 ml Fraktionen, die bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert wurden. Für die Ankonzentrierung der in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurde StrataClean Resin (Agilent Technologies) verwendet. Dabei handelt es sich um hydroxylierte Silicapartikel, die unspezifisch Proteine binden. Jeder Fraktion wurden 5 µl StrataClean Resin zugegeben und die Proben für 15 min bei Raumtemperatur rotiert. Anschließend wurden die Fraktionen für 2 min bei 2000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Silicapartikel wurden in 40 µl 2x Laemmli Puffer aufgenommen und bei –20°C gelagert. Für die Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot wurden jeweils 20 µl eingesetzt.

#### Material:

20% Ethanol

Chromatographiepuffer	20 mM	Tris/Cl pH 8
	10% (v/v)	Glycerin
	175 mM	NaCl
	0,5 mM	DTT
	1 mM	PMSF

StrataClean Resin (Agilent Technologies)

2x Laemmli Puffer (Sigma)

#### 2.4.14 Gelretardationsexperiment

Das Prinzip eines Gelretardationsexperiments (*electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) beruht darauf, dass die Geschwindigkeit, mit der ein doppelsträngiges Oligonukleotid durch ein natives Polyacrylamidgel wandert, beeinflusst wird, wenn das Oligonukleotid von ebenfalls im Versuchsansatz enthaltenen Proteinen gebunden wird. Während das freie Oligonukleotid nach Anlegen einer Spannung relativ schnell durch das Gel wandert, wird es durch bindende Proteine verlangsamt. Durch das Trocknen des Gels und Auflegen eines Röntgenfilms kann man dann das radioaktiv markierte Oligonukleotid sichtbar machen.

Verwendet wurden entweder Hochsalz-Kernextrakte (vgl. 2.4.5) oder nach Aufreinigung über einen Flag-Tag eluierte Proteine (vgl. 2.4.7). Um die Bedingungen in verschiedenen Experimenten möglichst konstant zu halten, wurden Kernextrakte entweder unverdünnt eingesetzt oder mit Kernextrakt aus untransfizierten Zellen (bei unterschiedlicher Verdünnung) bzw. Puffer C (bei gleicher Verdünnung aller Proben) auf 5 µl eingestellt. Elutionen nach Flag-Aufreinigung wurden entweder unverdünnt eingesetzt oder mit Elutionspuffer auf 7 µl eingestellt. Die Salzkonzentration (NaCl + KCl) in den Bindungsreaktionen betrug immer 145 mM.

Die Ansätze wurden für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl radioaktiv markiertem Oligonukleotid (12.000 – 18.000 cpm) folgte eine weitere Inkubation auf Eis für 20 min. Für die Auftrennung von gebundenem und freien Oligonukleotid wurde ein 4%iges natives Polyacrylamid-Gel verwendet. Die Elektrophorese erfolgte für 15 min bei 100 V und dann bei 140 V, bis nach etwa zwei Stunden die gewünschte Auftrennung erreicht war. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE verwendet. Anschließend wurde das Gel auf Whatman Papier im Gelrockner bei 80°C für zwei Stunden getrocknet und dann eine Autoradiographie bei –80°C durchgeführt.

#### Bindungsreaktion

##### EMSA mit Kernextrakt:

5,5 µl	H <sub>2</sub> O
4 µl	5x BSB
1 µl	BSA (10 mg/ml)
1,5 µl	Poly(dIdC) (0,5 mg/ml)
1 µl	DTT (0,1 M)
1 µl	KCl (1 M)
5 µl	Kernextrakt
1 µl	Oligonukleotid

##### EMSA nach Flag-Aufreinigung:

4,5 µl	H <sub>2</sub> O
4 µl	5x BSB
1 µl	BSA (10 mg/ml)
1,5 µl	Poly(dIdC) (0,5 mg/ml)
1 µl	DTT (0,1 M)

---

	7 µl	Eluat
	1 µl	Oligonukleotid
5x BSB	62,5 mM	HEPES pH7,5
	31,25 mM	MgCl <sub>2</sub>
	45%	Glycerol
	25 µM	ZnSO <sub>4</sub>
	0,25%	NP-40
4% Polyacrylamidgel	12 ml	40% Acrylamid/Bisacrylamid (40:1)
	12 ml	5x TBE
	96 ml	H <sub>2</sub> O
	840 µl	APS
	84 µl	TEMED

#### 2.4.15 Dualer Luciferase Assay

Das Prinzip des Luciferase-Assays beruht darauf, dass das Enzym Luciferase ein Substrat oxidiert und dabei Photonen emittiert werden. Das so entstehende Lichtsignal ist proportional zur vorhandenen Enzymmenge. Bei einem dualen Luciferase-Assay werden sowohl Firefly-(*Photinus pyralis*) als auch Renilla-(*Renilla reniformis*) Luciferase verwendet, da ihre Aktivität unabhängig voneinander gemessen werden kann. Dies ist möglich, da beide Enzyme unterschiedliche Enzymstrukturen und Substratspezifitäten aufweisen. Während Firefly-Luciferase D-Luciferin in Oxyluciferin umsetzt, katalysiert Renilla-Luciferase die Oxidation von Coelenterate-Luciferin (Coelentarazin) zu Coelenteramid. Im Verlauf des Assays wird zuerst die Aktivität der Firefly-Luciferase gemessen. Durch Zugabe des „Stop & Glo“ Puffers wird diese Aktivität inhibiert und gleichzeitig das Substrat für Renilla-Luciferase zugegeben, so dass nun deren Enzymaktivität gemessen werden kann. Während Firefly-Luciferase verwendet wird, um die Aktivierung eines Reportergens durch ein zu untersuchendes Protein zu ermitteln, wird Renilla-Luciferase zur Normalisierung auf Zellzahl und Transfektionseffizienz eingesetzt.

Zur Untersuchung der transkriptionellen Aktivität verschiedener Gal4-Sp2 Fusionsproteine wurden HEK293 Zellen in 24-well Platten (je  $6 \cdot 10^4$  Zellen) mit je 50 ng Aktivatorplasmid (pSG424), 200 ng Reporterplasmid (pGAWG5E1b) und

0,5 ng pRL-SV40 zur Normalisierung transfiziert. Bei dem Reporterplasmid handelt es sich um ein Konstrukt, das für die Firefly-Luciferase unter der Kontrolle eines Gal4-getriebenen Promotors mit fünf Gal4-Bindungsstellen kodiert. Das Aktivatorplasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus der Gal4-DNA bindenden Domäne (Gal4-DBD) und dem zu untersuchenden Protein. Die zur Normalisierung eingesetzte Renilla-Luciferase wird von einem SV40-Promotor kontrolliert und sollte in allen Zellen gleich stark exprimiert werden.

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 200 µl Passivem Lysis-Puffer für 15 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden je 20 µl Zellextrakt oder Passiver Lysis-Puffer (Leewert) in einem Sarstedt Polystyrol-Röhrchen vorgelegt. Zur Messung wurde ein Berthold Auto-Luminometer mit Injektionsvorrichtung verwendet. Nach dem Einstellen der Probenröhrchen wurden automatisch je 100 µl Luciferase Assay Reagent II injiziert und durch die Aktivität der Firefly-Luciferase entstehende Lichtemission sofort über ein Intervall von 10 Sekunden gemessen. Im Anschluss an die Messung aller Proben wurde die Injektionseinrichtung gründlich gespült. Nach Injektion von 100 µl Stop & Glo-Reagent erfolgte die Ermittlung der Renilla-Luciferase Aktivität durch Messung der Lichtemission über ein Intervall von 10 Sekunden.

Material:

1x PBS

Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega

#### **2.4.16 Gekoppelte in vitro Transkription/Translation mit anschließender Co-Immunpräzipitation**

Für die nicht-radioaktive gekoppelte in vitro Transkription/Translation (IVT) wurde das TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) nach Herstellerangaben verwendet. Ein 50 µl-Ansatz enthielt 25 µl Retikulozytenlysat, 2 µl 25x TNT Puffer, 1 µl RNA-Polymerase (je nach Plasmid T7 oder Sp6), 1 µl Aminosäuremix ohne Methionin, 1 µl Aminosäuremix ohne Leucin, 1 µl RNase Inhibitor (40 U/µl), 1 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl) und 18 µl H<sub>2</sub>O. Die Inkubation erfolgte für 90 min bei 30°C. Verwendet wurden die folgenden Plasmide: pCMV-Sport6-mSp2, pMyc-RACK1, pGADT7-RecAB-PHF11, - RNF197 und – RACK1.

---

Zur Überprüfung von im Hefe-zwei-Hybrid System identifizierten von Protein-Protein Interaktionen wurden im Anschluss an die gekoppelte in vitro Transkription/Translation Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Dazu wurden je 50 µl Sp2-Ansatz mit 50 µl eines potentiellen Interaktionspartner gemischt und für 60 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Ansätze mit 1x TBS auf 500 µl verdünnt, Antikörper für die Immunpräzipitation zugegeben. (1 µl  $\alpha$ HA für pGADT7-RecAB Transkripte, 2 µl  $\alpha$ RACK1 oder 6 µl  $\alpha$ Sp2 (affinitätsgereinigt)) und die Ansätze für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Zur Bindung der Antikörper wurden dann 25 µl Bettvolumen Protein A Sepharose ( $\alpha$ Sp2) oder Protein G Sepharose ( $\alpha$ RACK1,  $\alpha$ HA), die zuvor durch dreimaliges Waschen mit 1x TBS vorbereitet worden war, zugegeben und die Ansätze für 60 min rotierend bei 4°C inkubiert. Schließlich wurde die Sepharose fünf Mal mit je 1 ml 1x TBS/0,05% NP-40 gewaschen und in 25 µl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen. Proben aus Input, Überstand und Sepharose konnten dann mittels Western Blot analysiert werden.

#### Material:

TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega)

RNase Inhibitor (RNasin, Promega)

Protein A Sepharose (GE Healthcare)

Protein G Sepharose (GE Healthcare)

---

## 2.5 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen und Mäusen

### 2.5.1 Das Hefe-zwei-Hybrid System: Prinzip und Ablauf

Das Hefe-zwei-Hybrid System (yeast two-hybrid, Y2H) dient der Identifikation von Protein-Protein Interaktionen. Dazu nutzt man den Transkriptionsfaktor GAL4 aus der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*). GAL4 besteht aus einer Aktivierungsdomäne (AD) sowie einer DNA-bindenden Domäne (BD) und aktiviert die Expression von Genen, die unter der Kontrolle von GAL4-abhängigen Promotoren stehen. Um Protein-Protein Interaktionen zu untersuchen, fusioniert man beide Domänen (BD und AD) mit den zu untersuchenden Proteinen oder Proteinfragmenten und exprimiert beide Fusionsproteine gemeinsam in Hefezellen, die auxotroph sind für Adenin und Histidin. Eine positive Interaktion zwischen BD-Fusion („Köder“) und AD-Fusion („Beute“) bringt GAL4-BD und GAL4-AD in enge räumlich Nähe und ermöglicht so die GAL4-abhängige Expression von Genen für die Histidin- und Adenin Synthese (HIS3 und ADE2), die als Reportergene fungieren. Diese Hefezellen können nun auf Medium ohne Histidin und Adenin wachsen. Als dritter Reporter dient das MEL1-Gen, das für eine  $\alpha$ -Galaktosidase kodiert. Dieses Enzym wird von den Hefezellen sekretiert und setzt das im Medium enthaltene Substrat X- $\alpha$ -Gal um, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht.

Um bisher unbekannte Protein-Protein Interaktionen zu identifizieren, fusioniert man ein zu untersuchendes Protein (hier: Sp2 (1-112) und Sp2 (337-449)) mit der GAL4-BD und verwendet eine mit der GAL4-AD fusionierte mRNA-Bibliothek als Beute. Dazu wurde der Hefestamm AH109 mit einem Vektor (pFBT9), der für GAL4-BD-Sp2 (1-112) oder GAL4-BD-Sp2 (337-449) kodiert, transformiert und über Mating mit dem Bibliotheks-Stamm Y187 kombiniert. Verwendet wurde eine humane universelle Bibliothek (Clontech Mate and Plate<sup>TM</sup> Library – Universal Human (Normalized)). Im Anschluss an das Mating wurden die Zellen dann auf Reportergen-Aktivierung getestet, indem sie auf TDO/X- $\alpha$ -Gal-Platten (SD/-Leu-Trp-His + X- $\alpha$ -Gal) ausplattiert wurden. Um die Stringenz zu erhöhen, wurden positive Klone noch zwei Mal auf QDO/X- $\alpha$ -Gal-Platten (SD/-Leu-Trp-His-Ade + X- $\alpha$ -Gal) ausgestrichen. Dann wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, um die Interaktionspartner von Sp2 zu identifizieren. Plasmide, die für potentielle Kandidaten kodieren, wurden aus der Hefe isoliert, in Bakterien transformiert und vermehrt. Zur Kontrolle der Interaktionen wurden GAL4-

BD-Sp2 (1-112) oder GAL4-BD-Sp2 (337-449) und ihre potentiellen Interaktionspartner dann in Hefe (AH109) kotransformiert und erneut auf Interaktion getestet. Daraus hervorgegangene Kandidaten wurden schließlich in einer gekoppelten in-vitro Transkription/Translation mit anschließender Co-Immunpräzipitation auf Interaktion getestet (siehe 2.4.16).

### 2.5.1.1 Transformation von Hefezellen

Die Transformation von Hefezellen erfolgte nach der TE/Lithiumacetat-Methode (modifiziert nach Gietz et al 1992). Das dabei verwendete Lithiumacetat destabilisiert zusammen mit dem ebenfalls eingesetzten Polyethylenglykol (PEG 3350) die Zellmembran, indem es den Hefezellen Wasser entzieht. Dadurch werden die Zellen während eines Hitzeschocks permeabel und Plasmide können aufgenommen werden. Ebenfalls erforderlich ist eine hochmolekulare, einzelsträngige Träger-DNA, wie zum Beispiel denaturierte Lachs- oder Heringssperma-DNA.

Für die Transformation mussten zunächst kompetente Hefezellen hergestellt werden. Dazu wurden Einzelkolonien von einer Stammplatte mit einer Impföse entnommen, in 15 ml Flüssigmedium gelöst und über Nacht bei 30°C schüttelnd inkubiert. Die Übernachtskultur wurde am nächsten Morgen auf eine optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 0,3 verdünnt und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6-0,8 schüttelnd bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden zunächst durch Zentrifugation bei 2000 Upm für 5 min pelletiert, in 1 ml sterilem Wasser aufgenommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 1 ml TE/LiAc-Lösung aufgenommen, für 1 min bei 2000 Upm zentrifugiert und mit TE/LiAc-Lösung auf eine Zelldichte von etwa  $1 \cdot 10^9$  Zellen/ml eingestellt. Zur Berechnung der Zellzahl wurde die gemessene OD verwendet, wobei eine  $OD_{600}$  von 0,7 etwa  $1,7 \cdot 10^7$  Zellen/ml entspricht. Kompetente Hefezellen konnten direkt verwendet oder für eine Woche bei 4°C gelagert werden.

Für eine Transformation wurden 5 µl Lachssperma-DNA (10 mg/ml), die zuvor für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt worden war, in einem sterilen 2 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt und pro zu transformierenden Plasmid 1 µg DNA dazu gegeben. Dann wurden 50 µl kompetente Hefezellsuspension und 300 µl PEG/TE/LiAc-Lösung zugegeben und nach gründlichem Mischen für 30-90 min bei Raumtemperatur in einem Rotator Mixer (Starlab) inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte für 15 min bei 42°C. Danach wurden die Zellen



für 1 min bei 1000 Upm zentrifugiert und in 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 100 µl sterilem Wasser aufgenommen und auf vorgewärmte Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert. Die Platten wurden dann für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert, bis eine Koloniegröße von etwa 1-2 mm erreicht war.

Die Verwendung der selektiven Agarplatten hing von dem transformierten Plasmid, bzw. den transformierten Plasmiden bei Kotransformationen, ab. Der Vektor pFBT9 hebt die Auxotrophie für Tryptophan auf, pGADT7-Vektoren die Auxotrophie für Leucin. So wurden beispielsweise mit pFBT9 transformierte Hefezellen auf Minimalmedium ohne Tryptophan (SD/-Trp) ausplattiert.

#### Materialien:

TE/LiAc	10% (v/v)	1 M Lithiumacetat pH 7,5
	90% (v/v)	10/1 TE pH 7,5
PEG/TE/LiAc	40% (v/v)	PEG 3350
	0,1 M	Lithiumacetat pH 7,5
	10 mM	Tris/Cl pH 7,5
	1 mM	EDTA

#### 2.5.1.2 Mating und Selektion

Von AH109 Zellen, die mit pFBT9-Sp2 (1-112) oder pFBT9-Sp2 (337-449) transformiert worden waren, wurde eine Übernachtskultur in 50ml Selektionsmedium (SD/-Trp) angeimpft und für 16-20 Stunden bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bei 30°C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden dann in einer Neubauer-Zählkammer gezählt, für 5 min bei 1000 Upm pelletiert und nach Entnahme des Überstandes in 4-5 ml SD/-Trp Flüssigmedium resuspendiert, sodass eine Zelldichte von  $>1 \cdot 10^8$  Zellen/ml erreicht wurde. Ein 1 ml Aliquot des Bibliotheks-Stammes, das bei -80°C gelagert worden war, wurde im Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend in einen sterilen 2 l Erlenmeyerkolben überführt. Das Röhrchen wurde noch 2 Mal mit je 1 ml 2x YPDA ausgespült und diese Zellen ebenfalls in den Erlenmeyerkolben überführt. Die mit pFBT9 transformierten AH109-Zellen der Übernachtskultur wurden hinzu geben sowie 45 ml 2x YPDA mit 50 µg/ml Kanamycin. Die Inkubation des Mating-Ansatzes erfolgte bei 30°C und leicht schüttelnd, so dass

sich die Hefezellen gerade nicht am Boden des Kolbens absetzten (30-50 Upm). Nach etwa 24 Stunden wurde eine Probe des Mating-Ansatzes unter dem Mikroskop auf das Vorhandensein von Zygoten untersucht, die man an ihrer Kleeblatt-artigen Struktur erkennt. Waren Zygoten vorhanden, wurden die Zellen für 10 min bei 1000 Upm pelletiert. Der Erlenmeyerkolben wurde noch zwei Mal mit je 50 ml 0,5x YPDA ausgespült und dieses Medium verwendet, um die zuvor pelletierten Zellen zu resuspendieren. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Zellpellet in 10 ml 0,5x YPDA gelöst und das Volumen von Zellen und Medium gemessen.

Zur Kontrolle wurden je 100 µl einer 1/10, 1/100, 1/1000 und 1/10.000 Verdünnung auf SD/-Trp, SD/-Leu und SD/-Trp-Leu ausplattiert und bei 25°C inkubiert. Anhand dieser Platten konnten die Überlebensraten der GAL4-Sp2 Zellen und der Bibliotheks-Zellen bestimmt sowie die Mating-Effizienz berechnet werden.

Der restliche Mating-Ansatz wurde auf TDO/X- $\alpha$ -Gal-Platten ausplattiert, wobei pro 15 cm-Platte 200 µl eingesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte bei 25°C für 5-7 Tage. Positive Klone wurden mit sterilen Pipettenspitzen auf QDO/X- $\alpha$ -Gal umgestrichen, um die Stringenz zu erhöhen. Klone, die auch auf QDO/X- $\alpha$ -Gal wuchsen, wurden erneut auf QDO/X- $\alpha$ -Gal umgestrichen, um sicherzustellen, dass möglichst nur ein Bibliotheks-Plasmid pro Zelle enthalten war.

### 2.5.1.3 Kolonie-PCR

Verwendet wurde der Matchmaker Insert Check PCR Mix 2 (Clontech) wie vom Herstellen angegeben. Pro Ansatz wurden 25 µl steriles Wasser vorgelegt und mit einem sterilen Zahnstocher eine kleine Menge einer Hefekolonie von der Platte entnommen. Die Zellen wurden im Wasser gelöst und anschließend mit 25 µl PCR-Mix versetzt. Die PCR wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung	1 min	94°C
2. Denaturierung	10 s	98°C
3. Primeranlagerung und Verlängerung	3 min	68°C
4. Kühlen	10 min	4°C

Die Schritte 2 und 3 wurden insgesamt 30 Mal durchgeführt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte im 1% Agarosegel. PCR-Produkte wurden aufgereinigt (vgl. 2.3.2) und von einem kommerziellen Anbieter sequenziert (Seqlab GmbH, Göttingen).

#### **2.5.1.4 Plasmidextraktion aus Hefezellen**

Die Extraktion von Plasmiden aus Hefezellen erfolgte mit dem Easy Yeast Plasmid Isolation Kit (Clontech) nach Herstellerangaben.

Eine Hefekolonie mit dem aufzureinigenden Plasmid wurde auf einer 1x1 cm großen Fläche auf dem entsprechenden Selektionsmedium (SD/-Leu) ausgestrichen und für drei Tage bei 30°C inkubiert. In einem Reaktionsgefäß wurden 500 µl 10 mM EDTA vorgelegt und die Hälfte der Hefekolonie nach dem Abschaben von der Platte darin gelöst. Die Hefezellen wurden bei 12.000 Upm für 1 min pelletiert, der Überstand entfernt und die Zellen in 200µl ZYM Puffer resuspendiert. Dann wurden 20 µl Zymolase zugegeben und für 1 Stunde schüttelnd bei 30°C inkubiert. Durch die Aktivität der Zymolase wird die Zellwand der Hefezellen abgebaut und es entstehen Spheroplasten. Die weitere Plasmidpräparation verläuft nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, wie sie auch bei Bakterienzellen angewendet wird. Die Spheroplasten wurden zunächst bei 2000 Upm für 10 min pelletiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 250 µl Y1 Puffer mit RNase resuspendiert. Dann wurden 250 µl Y2 Lysis Puffer zugeben und vorsichtig gemischt. Die Lyse erfolgte für maximal 5 min bei Raumtemperatur und wurde durch die Zugabe von 300 µl Y3 Neutralisationspuffer und vorsichtiges Mischen gestoppt. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 12.000 Upm für 5 min sedimentiert. Nach Überführung des Überstandes in ein frisches Reaktionsgefäß wurde die Zentrifugation wiederholt und das aufgereinigte Lysat anschließend auf eine Säule geladen. Die Bindung der Plasmide an das Säulenmaterial erfolgte durch Zentrifugation bei 12.000 Upm für 1 min. Anschließend wurde die Säule durch Zugabe von 450µl Y4 Waschpuffer und Zentrifugation bei 12.000 Upm für 3 min gewaschen. Um letzte Reste des Waschpuffers zu entfernen, wurde die Zentrifugation wiederholt. Dann wurde die Säule in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben, nach Zugabe von 50 µl YE Elutionspuffer für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 12.000 Upm für 1min zentrifugiert. 3 µl der so erhaltenen Plasmidlösung wurden für die Transformation von *E. coli* (NEB5α, New England Biolabs) eingesetzt.

---

Material:

Zymolase Suspension (25 mg/ml)

ZYM Buffer

10 mM EDTA

Y1 Resuspension Buffer

Y2 Lysis Buffer

Y3 Neutralization Buffer

Y4 Wash Buffer

YE Elution Buffer

Die Zusammensetzung der Puffer wird vom Hersteller nicht angegeben.

#### **2.5.1.5 Herstellung von SDS-Gesamtzellextrakten aus Hefe**

Übernachtskulturen wurden am Morgen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3-04 verdünnt und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> bei 30°C und 200 Upm weiter inkubiert. Dann wurden die Hefezellen durch Zentrifugation bei 2000 Upm und 4°C pelletiert, in 1 ml Wasser resuspendiert und erneut pelletiert. Das Wasser wurde entfernt, das Zellpellet in 200 µl 2x Laemmli Puffer (Sigma) aufgenommen und die Zellen durch Inkubation bei 95°C für 10 min aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 13000 Upm für 10 min sedimentiert. Der Überstand konnte dann mittels Western Blot analysiert werden.

#### **2.5.2. Umgang mit Zellkulturen**

Der Umgang mit Zellkulturen (SL2, HEK, MEF) erfolgte unter sterilen Bedingungen. SL2-Zellen wurden bei 26°C, HEK und MEF bei 37°C und unter Zugabe von CO<sub>2</sub> zur Umgebungsluft (5% CO<sub>2</sub> Endkonzentration) kultiviert. Die Lagerung von Zellen erfolgte in mit 10% DMSO angereichertem Kulturmedium durch Einfrieren in Flüssigstickstoff. Dazu wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst, pelletiert (5 min 1000 Upm), in 900µl Kulturmedium resuspendiert und in einem Cryo-Röhrchen mit 100 µl DMSO vermischt. Vor der Überführung in Flüssigstickstoff wurden die Zellen zunächst für 2-3 Tage bei -80°C eingefroren. Um Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie bei Raumtemperatur aufgetaut, in 10 ml Kulturmedium überführt und zur Entfernung des DMSO bei 1000 Upm für 5 min zentrifugiert. Das

Zellpellet wurde dann in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und auf eine 10 cm Kulturschale überführt.

Zum Umsetzen mussten die Zellen zunächst von der Kulturschale gelöst werden. Konfluente SL2-Zellen konnten durch Aufklopfen abgelöst werden, während HEK-Zellen und MEFs zunächst mit 5 ml 1x PBS gewaschen und dann bei 37°C für einige Minuten mit Trypsin/EDTA (Gibco) behandelt wurden. Die Aktivität des Trypsins wurde durch das im zugegebenen Kulturmedium enthaltene fötale Kälberserum abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen in ein steriles 15 ml Röhrchen überführt und für 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Sollte die Zellzahl ermittelt werden, wurde vor dem Zentrifugieren ein Aliquot entnommen und anhand einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl/ml bestimmt. Im Anschluss wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in entsprechender Verdünnung auf neue Kulturschalen überführt.

### 2.5.3 Transfektion von Zellen

Die Transfektion von Zellen erfolgte mit FuGENE HD Reagenz (Roche), das nach Herstellerangaben verwendet wurde. Dazu wurden SL2- oder HEK-Zellen am Vortag in entsprechender Anzahl (siehe Tabelle 2.5.3) ausplattiert. Etwa 30 min vor der Transfektion wurde das Kulturmedium gewechselt. Dann wurde das Transfektionsgemisch, bestehend aus Plasmid-DNA, OptiMEM (Gibco) und FuGENE HD Reagenz, in sterilen Reaktionsgefäßen vorbereitet und nach 30 min Inkubation auf die Zellen aufgetropft. Die Ernte der Zellen erfolgte, soweit nicht anders angegeben, nach etwa 42 Stunden.

Tabelle 2.5.3: Zellzahlen und Plasmidmengen für Transfektionen

Kulturschale	Zelllinie	Zellzahl	Menge Plasmid
10 cm	HEK293	$1 \cdot 10^6$	1-3 µg
10 cm	SL2	$1 \cdot 10^7$	5 µg
15 cm	SL2	$3-4 \cdot 10^7$	15 µg

#### **2.5.4 Herstellung von murinen embryonalen Fibroblasten**

Murine embryonale Fibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*, MEF) wurden am embryonalen Tag (*embryonic day*, E) 9,5 und 13,5 hergestellt. Um Embryonen an einem bestimmten Tag präparieren zu können, musste der Beginn der Schwangerschaft bekannt sein. Dazu wurden am späten Nachmittag jeweils zwei heterozygote Weibchen mit einem heterozygoten Männchen in einem Käfig zusammen gesetzt. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen auf das Vorhandensein eines vaginalen Schleimpfropfes (*Plug*) untersucht, der sich nach der Paarung bildet und für einige Stunden in der Vagina verbleibt, um eine weitere Begattung zu verhindern. Weibchen, die einen Plug aufwiesen, wurden dann von den Männchen getrennt. Der Tag, an dem ein Plug nachweisbar ist, ist Tag 0,5 der Embryonalentwicklung (E 0,5), da man davon ausgeht, dass die Paarung nachts statt findet. Sollten MEFs an E 13,5 präpariert werden, wurden die Weibchen an E 0,5 und am Tag der geplanten Präparation gewogen. Um von einer Schwangerschaft ausgehen zu können, sollte ein Weibchen in dieser Zeit mindestens 3 g zugenommen haben. Für E 9,5 erwies sich das Kriterium der Gewichtszunahme von etwa 1 g als unzuverlässig, so dass auf die Gewichtskontrolle verzichtet wurde. Aufgrund der unterschiedlichen Entwicklungsstadien von Embryonen an E 9,5 und E 13,5 wurde bei der Präparation der Embryonen und Herstellung der MEFs, wie unten beschrieben, unterschiedlich vorgegangen. Entscheidend für die Herstellung von MEFs war, dass die Embryonen zum Zeitpunkt der Präparation noch einen Herzschlag aufwiesen, da sonst die Gewebe schnell nekrotisch werden und keine MEFs mehr auswachsen können.

Die Präparation wurde immer unter möglichst sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Instrumente wurden vor ihrer Verwendung bei 180°C sterilisiert und während der Präparation immer wieder in 70% Ethanol gewaschen.

#### **Herstellung von MEFs an E 9,5**

Neun Tage nach einer positiven Plugkontrolle wurden die Weibchen durch Genickbruch getötet und zur Desinfektion für etwa 1 min in 70% Ethanol getaucht. Dann wurde der Bauchraum eröffnet, der Uterus entnommen und in sterilem PBS auf Eis aufbewahrt. Jeder einzelne Embryo befindet sich mit seiner Plazenta und von der Fruchtblase umgeben in einer weißen, schwammigen Struktur, der Dezidua. Die Deziduen erscheinen in den beiden Uterushörnern wie Kugeln aneinander gereiht.

Zur Präparation unter einem Stereomikroskop wurde jede „Kugel“ einzeln entnommen, die muskulösen Uterusschichten entfernt und der Embryo aus der Dezidua freigelegt. Zur Genotypisierung wurden die Fruchtblasen in sterile Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Die Embryonen wurden nach dem Freilegen vorsichtig mit einer abgeschnittenen 1 ml-Pipettenspitze in eine 12-well Zellkulturschale mit sterilem PBS überführt, auf Eis aufbewahrt und so schnell wie möglich weiter verarbeitet. Unter einer Sicherheitswerkbank wurde das PBS entfernt, einige Tropfen Trypsin/EDTA (Gibco) auf den Embryo gegeben und die schräg gestellte Zellkulturschale für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 1,5 ml MEF-Medium zugegeben, mit einer sterilen 5 ml Glaspipette mehrmals auf- und ab pipettiert, ohne dabei Luftblasen zu erzeugen, und in frische 12-well Zellkulturschalen überführt. Wichtig war dabei, den Embryo nicht zu stark zu zerkleinern, da MEFs aus Gewebestücken wachsen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Das Auswachsen von MEFs konnte am nächsten Tag beobachtet werden.

### **Herstellung von MEFs an E 13,5**

Bei einer Gewichtszunahme von mindestens 3 g wurden Weibchen 13 Tage nach der positiven Plugkontrolle durch Genickbruch getötet und zur Desinfektion für etwa 1 min in 70% Ethanol getaucht. Dann wurde der Bauchraum eröffnet und beide Uterushörner in steriles PBS überführt. An E 13,5 sind die Embryonen bereits deutlich im Uterus zu sehen und so groß, dass die Präparation ohne Stereomikroskop durchgeführt werden kann. Jeder Embryo wurde einzeln entnommen und in PBS auf Eis aufbewahrt. Für die Genotypisierung wurde die Schwanzspitze in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und bis zur Extraktion der DNA (vgl. 2.3.6) auf Eis aufbewahrt. Kopf und Leber wurden verworfen. Der Rumpf und die Gliedmaßen wurden mit einem Skalpell zerkleinert, in ein steriles 15 ml Röhrchen überführt und auf Eis aufbewahrt. Die weitere Präparation erfolgte in einer Sicherheitswerkbank. Das PBS wurde entfernt, die Gewebestücke nochmals mit 10 ml PBS gewaschen und nach Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA (Gibco) für 30 min bei 37°C inkubiert. Dabei wurde die Suspension nach jeweils 10 min vorsichtig gemischt. Anschließend wurden 10 ml MEF-Medium zugegeben, durch Auf- und Abpipettieren mit einer sterilen Glaspipette die Stückchen weiter zerkleinert und die Suspension schließlich in eine 10 cm Zellkulturschale überführt. Die Inkubation

erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen gegebenenfalls passagiert.

### 2.5.5 Immunfärbung von Zellen

Für Immunfärbungen wurden Zellen in 6-well Kulturschalen auf Deckgläsern ausplattiert, fixiert und zum Nachweis von Sp2 mit spezifischen Antikörpern behandelt. Dazu wurden zunächst die Deckgläser durch Waschen in Methanol und anschließende Lagerung in 70% Ethanol vorbereitet. Direkt vor ihrer Verwendung wurden die Deckgläser aus dem Ethanol entnommen, die Kante abgetupft und nach dem Verdunsten des restlichen Ethanols in die Kulturschale gelegt. Dann wurden  $5 \cdot 10^4$  Zellen in 500 µl Kulturmedium zugegeben und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen drei Mal mit je 500 µl 1x PBS gewaschen und durch Zugabe von 500 µl 1x PBS/4% PFA bei Raumtemperatur für 25 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 500 µl 1x PBS für je 5 min unter leichtem Schütteln, wurden die Zellen durch Zugabe von 1x PBS/0,2% Triton X-100 für 20 min bei Raumtemperatur permeabilisiert und anschließen dreimal gewaschen. Durch Zugabe von 1x PBS/3% BSA und Inkubation bei 4°C über Nacht oder 1 Stunde bei Raumtemperatur wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Die Primärantikörper (vgl. Tabelle 2.2.9a) wurden in 1x PBS/3% BSA folgendermaßen verdünnt:

Kaninchen $\alpha$ Sp2 affinitätsgereinigt	1:50
Maus $\alpha$ Flag	1:240

Pro Ansatz wurden 150 µl Antikörperlösung auf Parafilm, der in eine Plastikschaale gelegt worden war, getropft. Dann wurden die Deckgläser mit der Zellseite nach unten darauf gelegt, die Schale mit einem Deckel verschlossen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1x PBS erfolgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern (vgl. Tabelle 2.2.9b). Um die an die Antikörper gekoppelten Fluorophore vor Licht zu schützen, erfolgten ab hier alle Inkubationen im Dunkeln. Eingesetzt wurden ein Cy3-konjugierter  $\alpha$ Maus Antikörper (1:200) und ein Alexa Fluor 594-konjugierter  $\alpha$ Kaninchen Antikörper (1:200). Im Anschluss wurde drei Mal gewaschen und die Zellen zur Anfärbung der DNA im Zellkern mit 100 µl 4',6 Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid- (DAPI) Lösung (1 mg/ml in 1xPBS, Roche) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem Einbetten wurden die Deckgläser drei Mal gewaschen. Pro Deckglas wurde ein



---

Objektträger durch Auftropfen von 10 µl Vectashield Mounting Medium (Vectorlabs) vorbereitet. Das Deckglas wurde aufgelegt, überschüssiges Vectashield Mounting Medium wurde entfernt und das Deckglas nach dem Trocknen mit klarem Nagellack versiegelt.

---

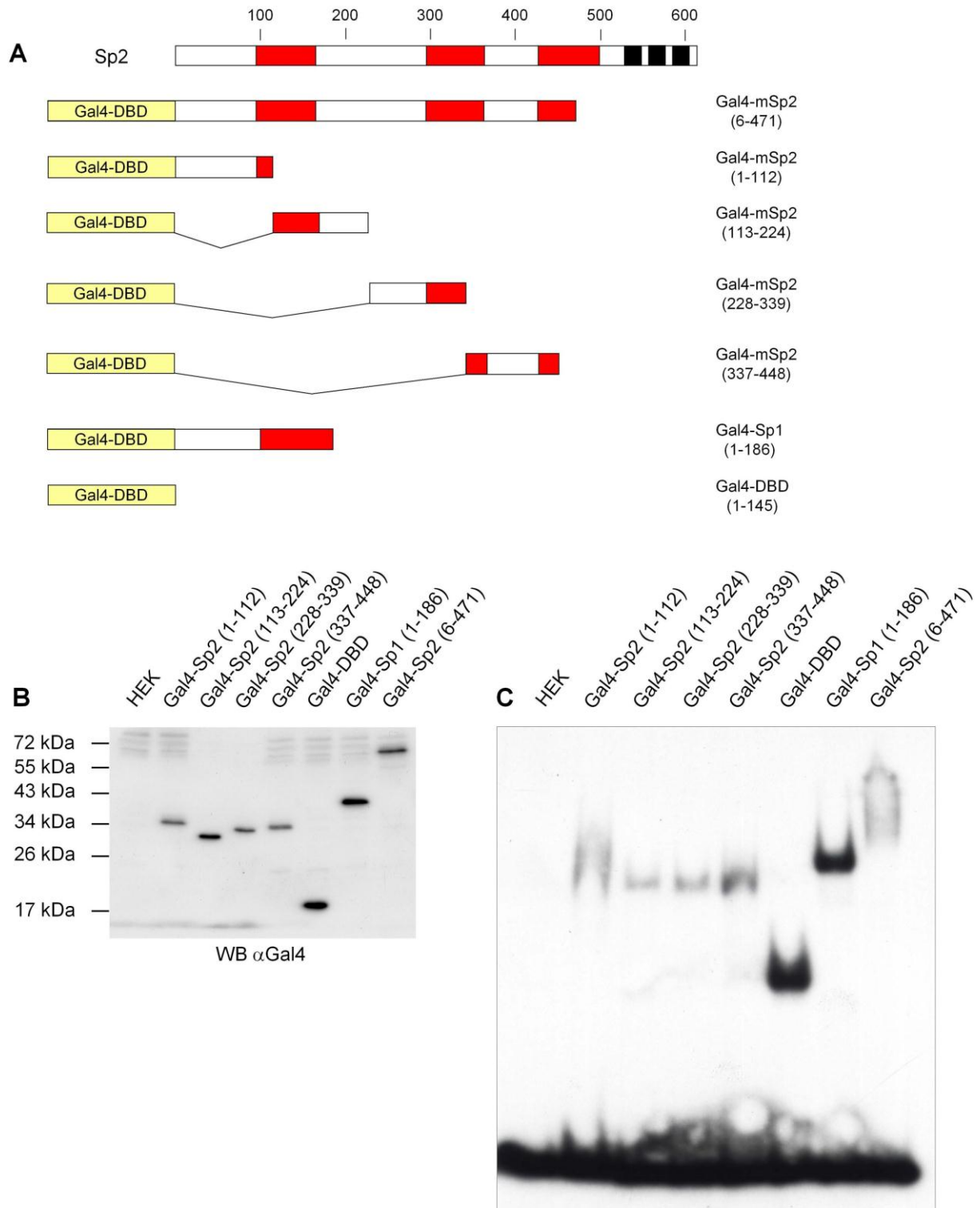
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Analyse der DNA-Bindungseigenschaften von Sp2

Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass weder endogenes Sp2 aus HEK293 Zellen noch in SL2-Zellen exprimiertes Sp2 (Baur 2005, Sadic 2009) in Gelretardierungsexperimenten (*electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) an ein GC-Box Oligonukleotid bindet, während dieses Oligonukleotid von Sp1, Sp3 und Sp4 mit hoher Affinität gebunden wird. Auch nach der Fusion an die Gal4-DNA bindende Domäne verhält sich Sp2 anders als die übrigen Sp-Faktoren, da es das Gal4-Oligonukleotid zwar bindet, aber im Gegensatz zu einem vergleichbaren Gal4-Sp1 Fusionsprotein keine distinkte Bande, sondern ein hochmolekularer „Schmier“ entsteht. Zudem scheint es Bereiche in Sp2 zu geben, welche die DNA-Bindung inhibieren, da die Zinkfinger-Region allein durchaus das GC-Box Oligonukleotid bindet (Baur 2005). Um nun die DNA-Bindungseigenschaften von Sp2 näher zu analysieren, wurden weitere EMSAs durchgeführt.

#### 3.1.1 DNA-Bindung von Gal4-Sp2 Fusionsproteinen

Volle-Länge Sp2 bindet nicht an DNA, während die Zinkfingerregion allein ein GC-Box Oligonukleotid bindet. Daher lag die Vermutung nahe, dass es Bereiche im Sp2 Protein gibt, die die DNA-Bindung verhindern. Um zu untersuchen, wo sich diese Bereiche befinden, wurde zunächst der N-terminale Teil von Sp2 in vier Fragmente unterteilt und C-terminal an die Gal4-DNA-bindende Domäne (Aminosäuren 1-147) fusioniert. Diese Fusionsproteine wurden in HEK293 Zellen exprimiert, aus denen Kernextrakte hergestellt wurden, die dann mit radioaktiv markiertem Gal4-Oligonukleotid im EMSA eingesetzt wurden. Gal4-Sp2 (6-471), Gal4-Sp1 (1-186) und Gal4-DBD dienten dabei als Kontrollen (Abb. 3.1.1.1). Gal4-DBD und Gal4-Sp1 (1-186) binden das Gal4-Oligonukleotid, während Gal4-Sp2 (6-471) ein deutlich schwächeres Signal und einen hochmolekularen „Schmier“ aufweist. Auch die vier übrigen Gal4-Sp2 Fusionsproteine binden das Gal4-Oligonukleotid, wobei Gal4-Sp2 (1-112) und Gal4-Sp2 (337-449) ebenfalls „schmieren“, besonders Gal4-Sp2 (1-112) (Abb. 3.1.1.1 B). Die Schlussfolgerung aus diesem Experiment war, dass sich im Bereich der Aminosäuren 1-112 Regionen oder Motive befinden, die auf bisher

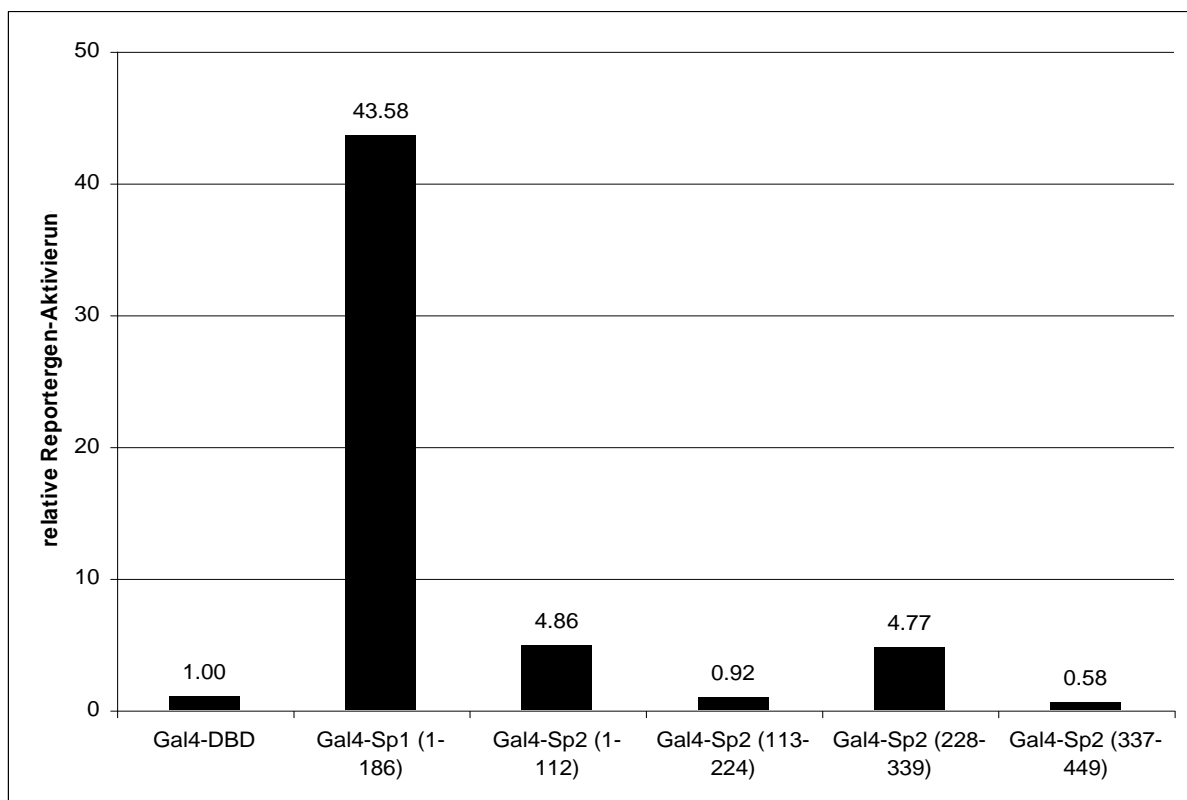


**Abbildung 3.1.1.1: DNA-Bindung von Gal4-Sp2 Fusionsproteinen. A. Schematische Darstellung der eingesetzten Gal4-Sp2 Fusionsproteine.** Es wurde jeweils die Gal4-DNA bindende Domäne mit einem Fragment des murinen Sp2 fusioniert. Als Kontrollen dienten ein entsprechendes Gal4-Sp1 Fusionsprotein sowie die Gal4-DNA bindende Domäne allein (gelb: Gal4-DBD; rot: glutaminreiche Region, schwarz: Zinkfinger). **B. Western Blot.** Die Überprüfung der Expression der Gal4-Fusionsproteine erfolgte mittels Western Blot. 1  $\mu$ l (Gal4-Sp2 (113-228) und Gal4-Sp2 (228-339)) oder 5  $\mu$ l Kernextrakt wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und die Gal4-Sp2 Fusionsproteine mit einem  $\alpha$ Gal4-DBD Antikörper detektiert. **C. EMSA.** Die in A

dargestellten Fusionsproteine wurden in HEK293 Zellen exprimiert und 0,2 µl (Gal4-Sp2 (113-228) und Gal4-Sp2 (228-339)) oder 1 µl Kernextrakt mit  $P^{32}$ -markiertem Gal4-Oligonukleotid inkubiert. Die Auftrennung erfolgte in einem nativen 4% PAA-Gel und Protein-DNA Komplexe wurden durch Autoradiographie detektiert.

unbekannte Weise die DNA-Bindung beeinträchtigen. Besonderes Gewicht verleiht diesem Befund die Tatsache, dass dies nicht nur mit den eigenen Zinkfingern, sondern auch nach Fusion an die DNA-bindende Domäne eines völlig anderen Proteins, nämlich Gal4, zu beobachten ist.

Da diese vier Gal4-Sp2 Fusionsproteine DNA binden, war nun die Frage zu klären, ob ein Gal4-getriebenes Reporter-gen aktiviert würde. Dazu wurden HEK293 Zellen gleichzeitig mit Plasmiden, die für die Gal4-Sp2 Fusionsproteine kodieren, und mit

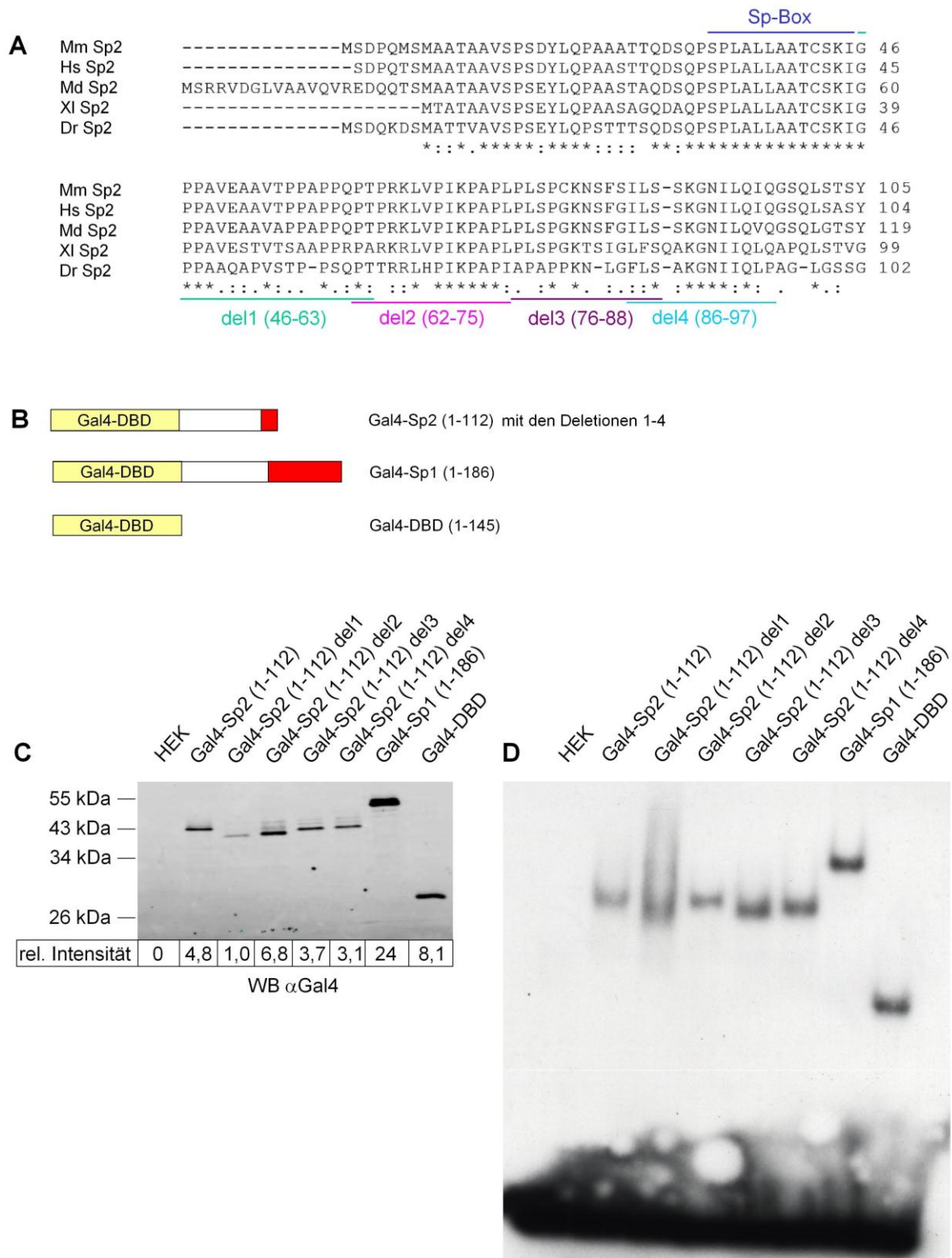


**Abbildung 3.1.1.2: Reporter-gen-Aktivierung durch Gal4-Sp2 Fusionsproteine.** Um die transkriptionelle Aktivität der in Abbildung 3.1.1.1 A dargestellten Gal4-Fusionsproteine zu testen, wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt. Dazu wurden HEK293 Zellen mit Expressionsvektoren für Gal4-Sp Fusionsproteine (pSG424) und einem Reporterplasmid (pGAWG5E1b), das für Firefly-Luciferase unter der Kontrolle eines Gal4-abhängigen Promotors kodiert, transfiziert. Zum Abgleich der einzelnen Transfektionseffizienzen wurde ein drittes Plasmid kotransfiziert, das für Renilla-Luciferase unter Kontrolle des SV40-Promotors kodiert (pRLSV40). Die enzymatische Aktivität der Firefly-Luciferase wurde ermittelt, die relative Reporter-gen-Aktivierung unter Einbeziehung der Renilla-Luciferase Aktivität berechnet und schließlich graphisch dargestellt.

einem Reporterkonstrukt, welches das Firefly-Luciferase Gen unter Kontrolle des Gal4-Promotors enthält, transfiziert. Während Gal4-Sp1 (1-186) bezogen auf Gal4-DBD allein eine 43,5 fache Reporter-gen-Aktivierung bewirkt, aktivieren Gal4-Sp2 (1-112) und Gal4-Sp2 (228-339) das Reporter-gen nur sehr schwach (4,86- bzw. 4,77-fach). Eine Aktivierung durch Gal4-Sp2 (113-224) und Gal4-Sp2 (337-449) war nicht festzustellen (Abb. 3.1.1.2). Unter den hier getesteten Bedingungen weisen also nur zwei von vier analysierten Bereichen des Sp2 Proteins eine aktivierende Funktion auf, die im Vergleich zu Sp1 gering ist.

### **3.1.2 DNA-Bindung von Gal4-Sp2 Fusionsproteinen mit Deletionen im Bereich von Aminosäuren 46-97**

Gal4-Sp2 (1-112) verhielt sich im EMSA deutlich anders als Gal4-Sp2 (113-224) und (228-339), da es das Gal4-Oligonukleotid zwar ebenfalls band, aber nicht als distinkte Bande erschien, sondern einen höhermolekularen „Schmier“ aufwies (vgl. 3.1.1). Da sich das Fragment Sp2 (1-112) auch nach Fusion an die Sp2-Zinkfinger deutlich anders verhielt als die übrigen Fragmente (Sadic 2009), lag die Vermutung nahe, dass in diesem Fragment Motive enthalten sind, welche die DNA-Bindung von Sp2 beeinträchtigen. Eine Analyse der Aminosäuresequenz ergab, dass es im Anschluss an die Sp-Box einen in Sp2 hochkonservierten Bereich gibt (Abb. 3.1.2 A). Dieser wurde daher ausgewählt, um Deletionen einzuführen und diese Deletionsmutanten anschließend im EMSA zu testen. In Gal4-Sp2 (1-112) wurden daher vier Regionen (AS 46-63, AS 62-75, AS 76-88 und AS 86-97) deletiert, die entstandenen Fusionsproteine in HEK293 Zellen exprimiert und gleiche Mengen im EMSA eingesetzt (Abb. 3.1.2 B-D). In diesem Experiment erschien das „Schmier“ von Gal4-Sp2 (1-112) weniger ausgeprägt als zuvor, wurde aber durch die Deletion der Aminosäuren 46-63 deutlich verstärkt. Wurden dagegen die Aminosäuren 62-75, 76-88 oder 86-97 deletiert, erschien im EMSA eine distinkte Bande, die vergleichbar ist mit Gal4-Sp1 (1-186) und Gal4-DBD. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass sich im Bereich dieser drei Deletionen, also zwischen Aminosäure 62 und 97, ein Motiv befindet, das Interaktionen mit anderen Proteinen vermittelt.

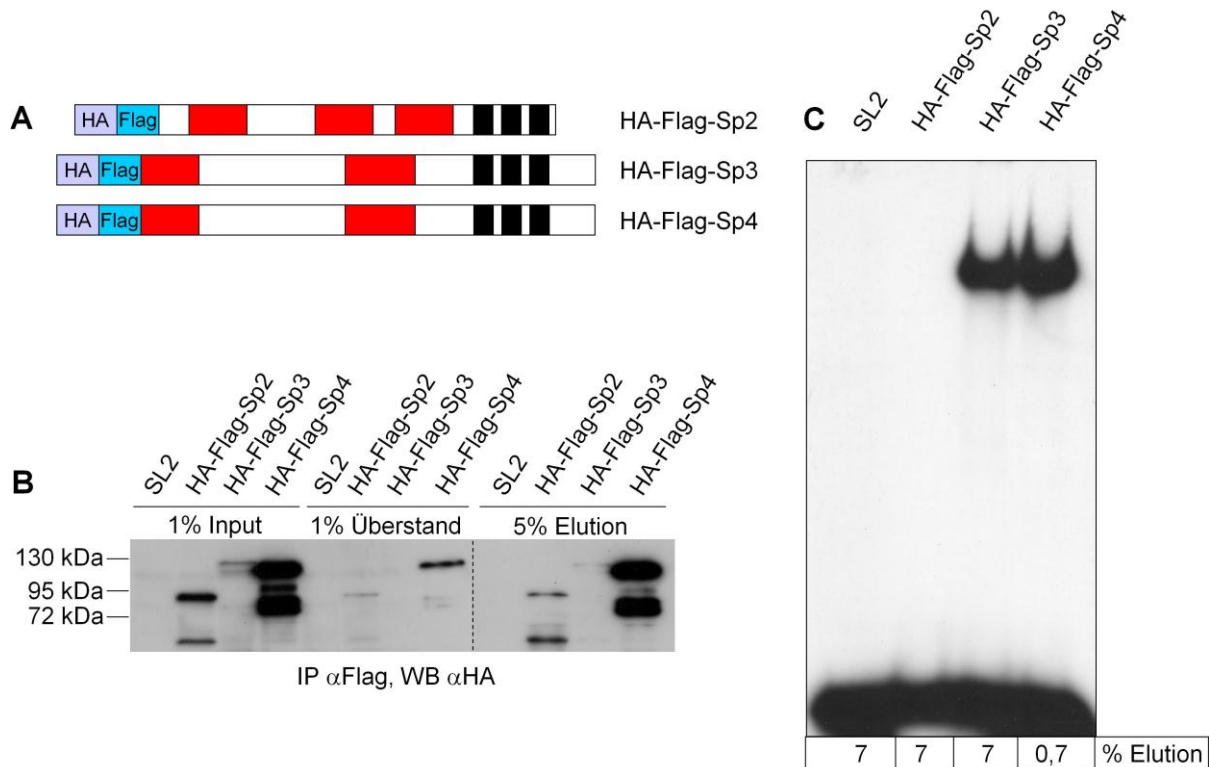


**Abbildung 3.1.2: DNA-Bindung von Gal4-Sp2 Fusionsproteinen mit internen Deletionen.**  
**A. Protein-Alignment der N-terminalen Region von Sp2.** Verglichen werden die N-terminalen Aminosäuresequenzen von Sp2 aus Mensch (*Homo sapiens*, Hs), Maus (*Mus musculus*, Mm), Beutelratte (*Monodelphis domestica*, Md), Zebrafisch (*Danio rerio*, Dr) und Krallenfrosch (*Xenopus laevis*, XI). Farblich hervorgehoben wurden die Lage von Sp-Box (blau), Deletion 1 (del1 46-63, grün), Deletion 2 (del2 62-75, pink), Deletion 3 (del3 76-88, lila) und Deletion 4 (del4 86-97, türkis).  
**B. Schematische Darstellung der eingesetzten Gal4-Sp2 Fusionsproteine.** Die Gal4-DNA bindende Domäne wurde mit Aminosäure 1-112 des murinen Sp2 fusioniert, wobei jeweils ein kleiner

Bereich innerhalb dieses Fragments deletiert wurde (siehe A). Als Kontrollen dienten ein Gal4-Sp1 Fusionsprotein sowie die Gal4-DNA bindende Domäne allein (gelb: Gal4-DBD; rot: glutaminreiche Region, schwarz: Zinkfinger). **C. Quantitativer Western Blot.** Die Überprüfung der Expression der Gal4-Fusionsproteine sowie deren Quantifizierung erfolgte mittels Fluoreszenz-Western Blot. Jeweils 3 µl Kernextrakt wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und die Gal4-Sp2 Fusionsproteine mit einem  $\alpha$ Gal4-DBD Antikörper detektiert. Die relative Intensität jeder spezifischen Bande wurde ermittelt und die Kernextrakt-Menge im EMSA so eingestellt, dass jeweils gleiche Mengen der Gal4-Fusionsproteine eingesetzt wurden. **D. EMSA.** Die in B dargestellten Fusionsproteine wurden in HEK293 Zellen exprimiert und Kernextrakte wurden mit  $P^{32}$ -markiertem Gal4-Oligonukleotid inkubiert. Die Auftrennung erfolgte in einem nativen 4% PAA-Gel und Protein-DNA Komplexe wurde durch Autoradiographie detektiert.

### 3.1.3 DNA-Bindung von Sp-Faktoren nach Aufreinigung über einen Flag-Tag

Aufgrund der Beobachtung, dass an Gal4-Oligonukleotid gebundenes Gal4-Sp2 (6-471) und Gal4-Sp2 (1-112) im EMSA nicht als distinkte Bande laufen, sondern einen höhermolekularen „Schmier“ aufweisen (Abb. 3.1.1.1), stellte sich die Frage, ob es Proteine gibt, die unter diesen Bedingungen an Sp2 binden und so dessen Laufgeschwindigkeit beeinträchtigen. Um nähere Informationen darüber zu erhalten, ob Sp2 mit anderen Proteinen interagiert, wurde ein Ansatz gewählt, bei dem volle-Länge Sp2 in SL2-Zellen exprimiert und anschließend über einen Flag-Tag aufgereinigt wurde. Dazu wurden HA-Flag-Sp2, HA-Flag-Sp3 und HA-Flag-Sp4 (Abb. 3.1.3 A) in SL2-Zellen exprimiert und der Zellextrakt mit  $\alpha$ Flag-Agarose inkubiert. Um sicher zu gehen, dass Proteine ohne Flag-Tag möglichst effizient entfernt werden, wurde zuerst drei mal mit einem Waschpuffer gewaschen, der 800 mM NaCl enthielt. Zur anschließenden Reduktion der Salzkonzentration wurde dann mit einem Waschpuffer mit 420 mM NaCl gewaschen. Zur Stabilisierung der Zinkfinger wurde den Wasch- und Elutionspuffern Zinksulfat zugegeben und im Anschluss an die Elution DTT hinzu gefügt. Die Mengen der HA-Flag Fusionsproteine wurden anhand der Expressionskontrolle mittels Western Blot im EMSA ausgeglichen. Während HA-Flag-Sp3 und HA-Flag-Sp4 nach der Aufreinigung im EMSA eine deutliche Bindung an das GC-Box Oligonukleotid zeigen, ist für HA-Flag-Sp2 keine DNA-Bindung zu beobachten (Abb. 3.1.3 B und C). Selbst nach stringenter Waschen, durch das Protein-Protein Interaktionen zu größten Teil aufgehoben sein sollten, ist also keine DNA-Bindung nachweisbar. Entweder geht Sp2 also ausgesprochen starke Protein-Protein Interaktionen ein, oder Wechselwirkungen mit anderen Proteinen sind nicht der Grund für die fehlende DNA-Bindung von volle-Länge Sp2 im EMSA.

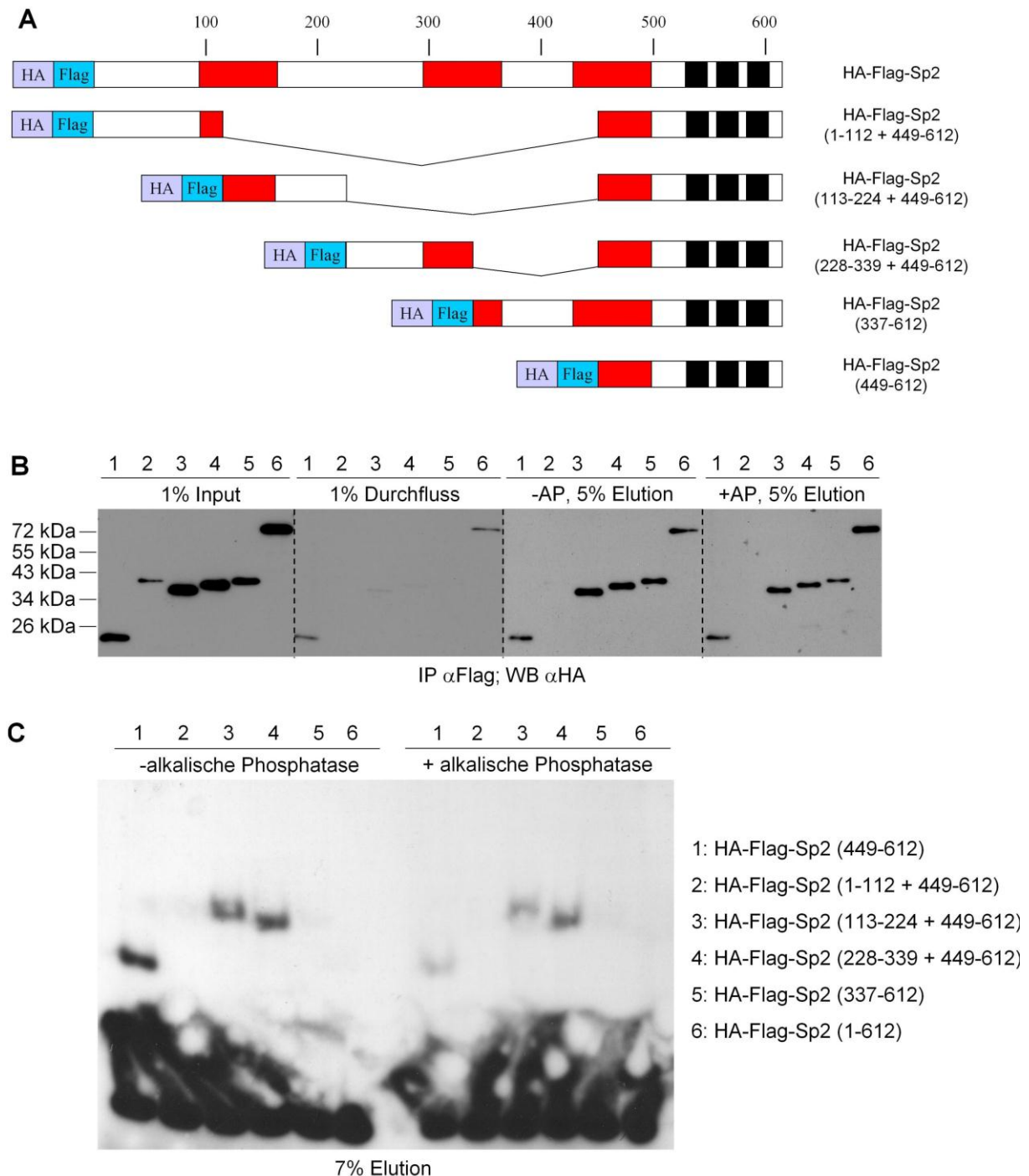


**Abbildung 3.1.3: DNA-Bindung von über Flag-Tag aufgereinigten Sp-Faktoren** **A. Schematische Darstellung der verwendeten HA-Flag-Sp Fusionsproteine** (hellblau: HA-Tag, blau: Flag-Tag, rot: glutaminreiche Regionen, schwarz: Zinkfinger). **B. Western Blot zur Kontrolle der Expression sowie der Aufreinigung mittels Flag-Tag.** Die angegebenen Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und HA-Flag-Fusionsproteine wurden mit einem  $\alpha$ HA-Antikörper detektiert. Die Intensität der Banden wurde im Verhältnis zueinander abgeschätzt und so ausgeglichen, dass im EMSA vergleichbare Mengen aller drei Fusionsproteine eingesetzt wurden. **C. EMSA.** HA-Flag-Sp2, HA-Flag-Sp3 und HA-Flag-Sp4 wurden in SL2 Zellen exprimiert, über den Flag-Tag aufgereinigt, mittels 3xFlag-Peptid eluiert und 0,7% (HA-Flag-Sp4) oder 7% der Elution wurden mit  $P^{32}$ -markiertem GC-Box Oligonukleotid inkubiert. Die Auftrennung erfolgte in einem nativen 4% PAA-Gel und Protein-DNA Komplexe wurden durch Autoradiographie detektiert.

### 3.1.4 DNA-Bindung von HA-Flag-Sp2 Fusionsproteinen nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Da auch über ein Flag-Epitop aufgereinigtes HA-Flag-Sp2 im EMSA nicht an DNA bindet, wäre es denkbar, dass die DNA-Bindung von Sp2 nicht durch interagierende Proteine, sondern durch posttranslationale Modifikationen reguliert wird. Bekannt ist, dass Sp2 an Serin 78 und Tyrosin 549 phosphoryliert wird (Dephoure et al., 2008). Um zu testen, ob diese Phosphorylierung die DNA-Bindung verhindert, wurden HA-Flag-Sp2 Fusionsproteine in SL2 Zellen exprimiert, an  $\alpha$ Flag-Agarose gekoppelt und mit alkalischer Phosphatase behandelt. Nach dem Waschen der gekoppelten Proteine erfolgte die Elution und anschließend ein EMSA mit GC-Box Oligonukleotid.





**Abbildung 3.1.4: DNA-Bindung von HA-Flag-Sp2 Fusionsproteinen nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase. A. Schematische Darstellung der verwendeten HA-Flag-Sp2 Fusionsproteine** (hellblau: HA-Tag, blau: Flag-Tag, rot: glutaminreiche Regionen, schwarz: Zinkfinger). **B. Western Blot zur Kontrolle der Expression und der Aufreinigung mittels Flag-Tag.** Die angegebenen Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und HA-Flag-Fusionsproteine wurden mit einem  $\alpha$ HA-Antikörper detektiert. **C. EMSA.** HA-Flag-Sp2 Fusionsproteine wurden in SL2 Zellen exprimiert, mit alkalischer Phosphatase behandelt (+AP) oder nicht behandelt (-AP), über den Flag-Tag aufgereinigt und mittels 3xFlag-Peptid eluiert. Anschließend wurden jeweils 7% der Elution mit  $P^{32}$ -markiertem GC-Box Oligonukleotid inkubiert, in einem nativen 4% PAA-Gel aufgetrennt und Protein-DNA Komplexe durch Autoradiographie detektiert.

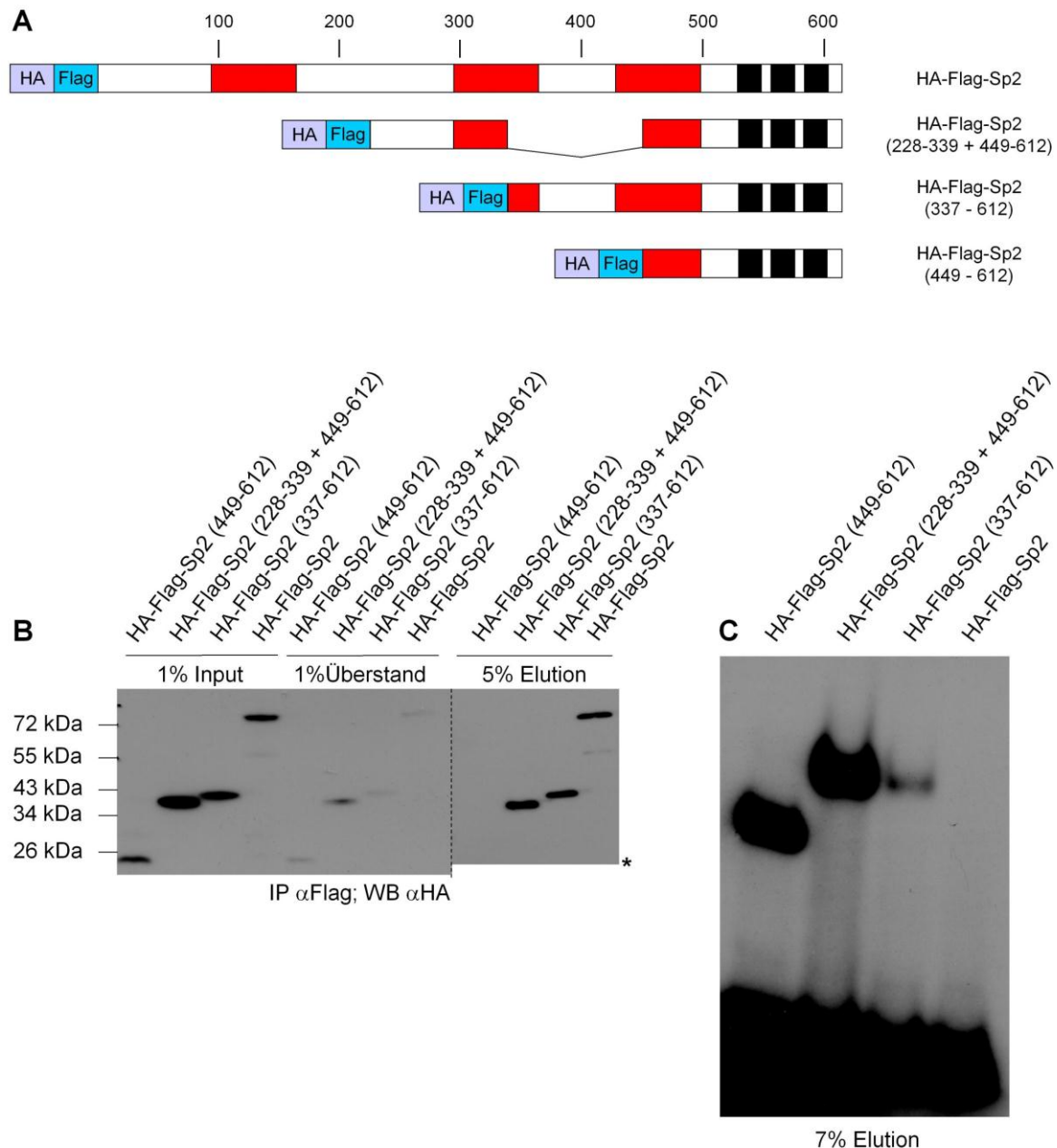
Um gleichzeitig zu untersuchen, welcher Bereich von Sp2 durch eine potentielle Phosphorylierung beeinflusst wird, wurde der N-terminale Teil von Sp2 in vier Fragmente unterteilt und diese jeweils mit den Sp2-Zinkfingern fusioniert (Abb. 3.1.4 A). Während HA-Flag-Sp2 (449-612), HA-Flag-Sp2 (113-224 + 449-612) und Flag-Sp2 (228-339 + 449-612) sowohl nach alkalischer Phosphatase-Behandlung als auch ohne Behandlung DNA binden, ist für HA-Flag-Sp2 (1-112 + 449-612) und HA-Flag-Sp2 (337-612) allenfalls eine sehr schwache DNA-Bindung zu beobachten (Abb. 3.1.4 B), die durch die Phosphatase-Behandlung nicht beeinflusst wird. Es ist also unwahrscheinlich, dass eine Phosphorylierung von Sp2 dessen DNA-Bindung verhindert.

### **3.1.5 DNA-Bindung von HA-Flag-Sp2 Fusionsproteinen nach Behandlung mit Phosphatase-Inhibitoren**

Auch wenn eine potentielle Phosphorylierung von Sp2 nicht dessen DNA-Bindung verhinderte, wäre es denkbar, dass die Phosphorylierung von Sp2 eine Rolle bei der DNA-Bindung spielt. Möglicherweise ist die Phosphorylierung erforderlich, um die DNA-Bindung zu ermöglichen. Daher wurden HA-Flag-Sp2, HA-Flag-Sp2 (228-339 + 449-612), HA-Flag-Sp2 (337-612) und HA-Flag-Sp2 (449-612) in SL2-Zellen exprimiert und die Zellextrakte mit Phosphataseinhibitor-Cocktail behandelt, um eine mögliche Phosphorylierung nicht zu verlieren. Auch unter diesen Bedingungen bindet HA-Flag-Sp2 (337-612) deutlich schwächer als die Kontrollen, während HA-Flag-Sp2 (1-612) keinerlei DNA-Bindung aufweist (Abb. 3.1.5). Die Phosphorylierung von Sp2 scheint also nicht an einer Regulation der DNA-Bindung beteiligt zu sein.

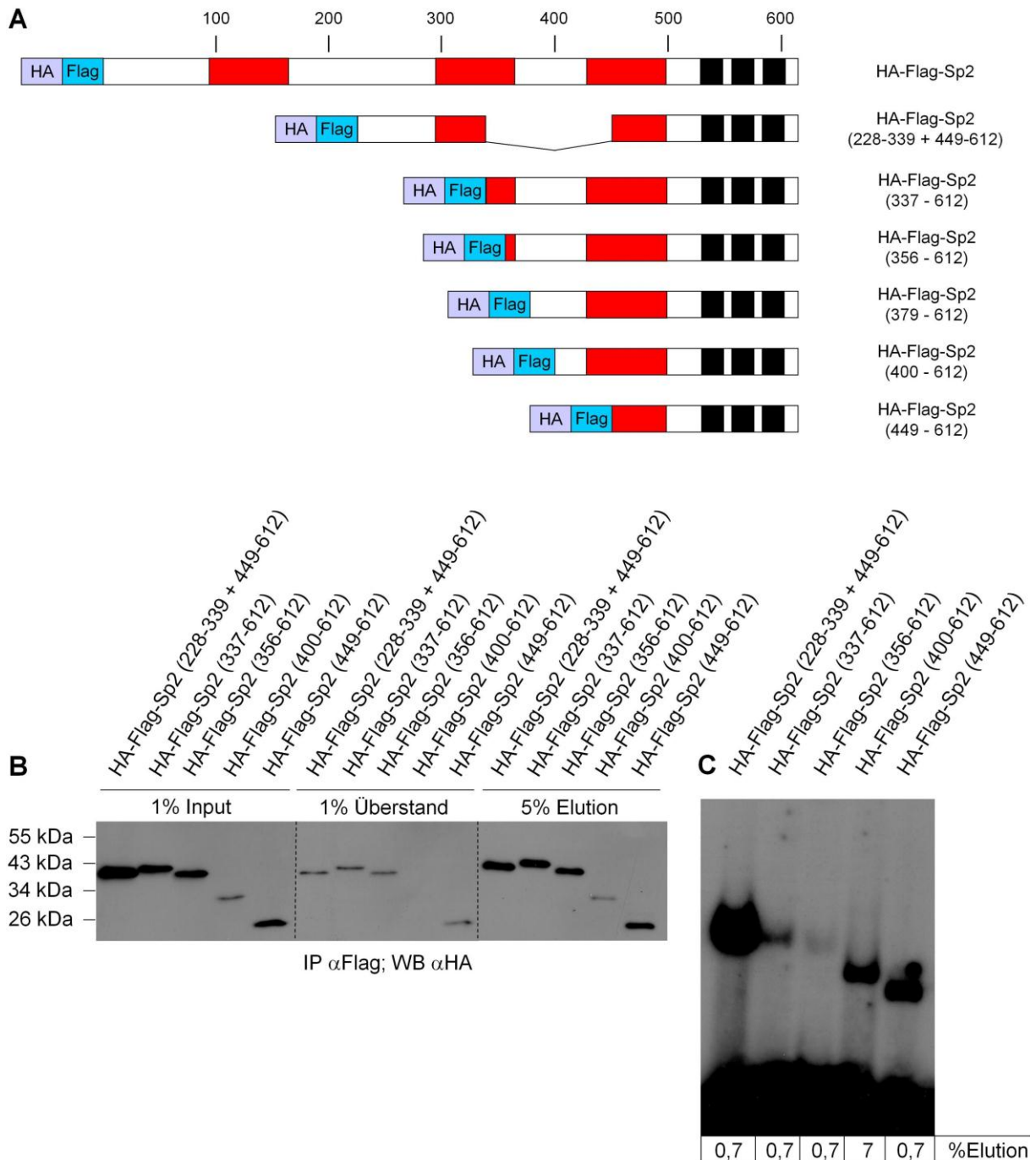
### **3.1.6 DNA-Bindung von N-terminalen HA-Flag-Sp2 Deletionsmutanten**

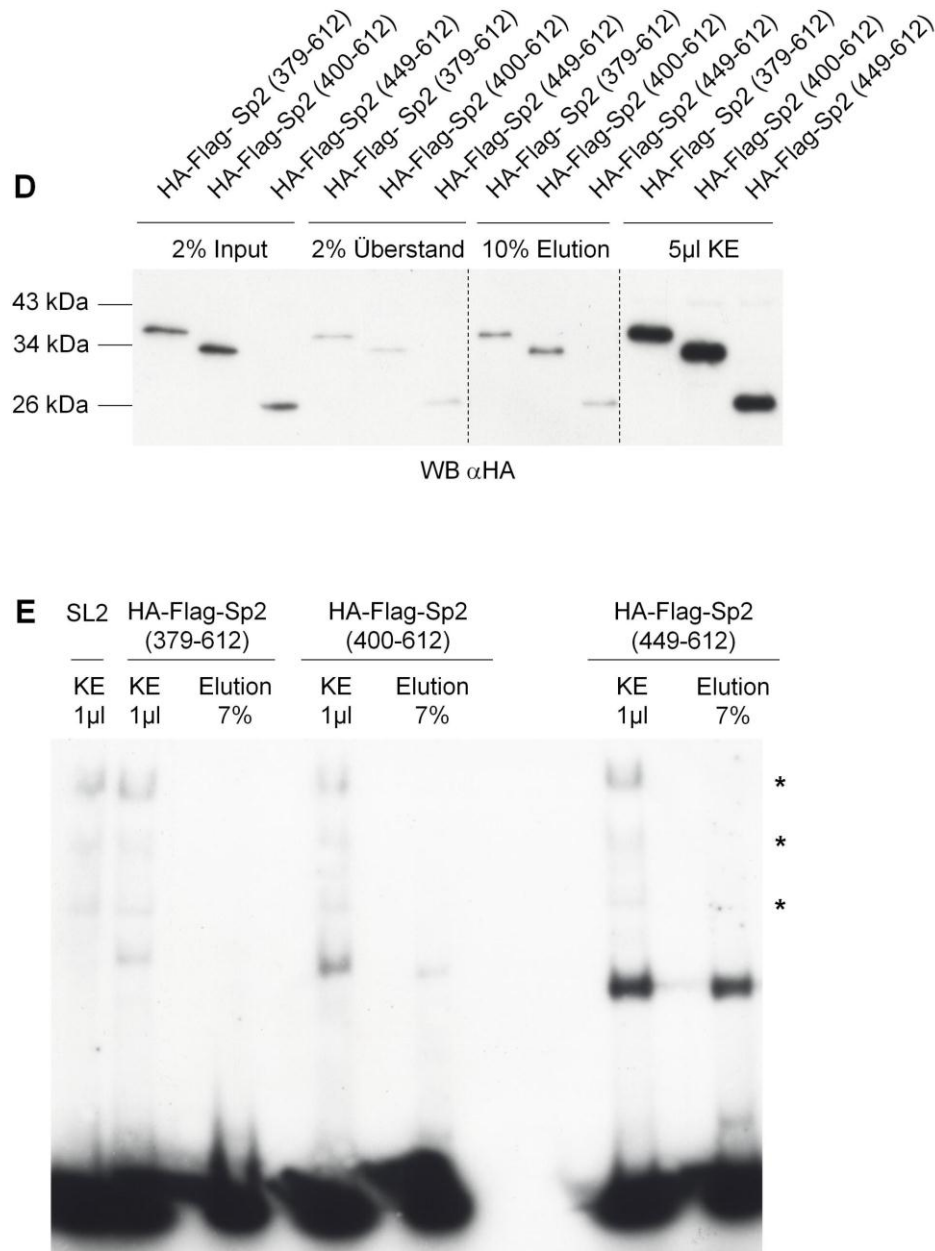
Da HA-Flag-Sp2 (337-612) nur schwach an DNA bindet, während HA-Flag-Sp2 (449-612) stark bindet, ist anzunehmen, dass sich zwischen Aminosäure 337 und 449 Sequenzen befinden, die die DNA-Bindung inhibieren. Aus diesem Grund wurde das Fragment 337-612 weiter verkürzt (Abb. 3.1.6 A) und nach Flag-Aufreinigung im EMSA eingesetzt. Zunächst wurden HA-Flag-Sp2 (356-612) und HA-Flag-Sp2 (400-612) verwendet (Abb. 3.1.6 B und C). Während HA-Flag-Sp2 (356-612) das GC-Box Oligonukleotid nicht bindet, bindet HA-Flag-Sp2 (400-612) ähnlich stark wie HA-Flag-Sp2 (449-612). Um den inhibitorischen Bereich weiter einzugrenzen, wurde eine



**Abbildung 3.1.5: DNA-Bindung von HA-Flag-Sp2 Fusionsproteinen nach Behandlung mit Phosphatase-Inhibitor Cocktail. A. Schematische Darstellung der verwendeten HA-Flag-Sp2 Fusionsproteine** (hellblau: HA-Tag, blau: Flag-Tag, rot: glutaminreiche Regionen, schwarz: Zinkfinger). **B. Western Blot zur Kontrolle der Expression und der Aufreinigung mittels Flag-Tag.** Die angegebenen Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und HA-Flag-Fusionsproteine wurden mit einem  $\alpha$ HA-Antikörper detektiert (\* HA-Flag-Sp2 (449-612) ausgelaufen). **C. EMSA.** HA-Flag-Sp2 Fusionsproteine wurden in SL2 Zellen exprimiert, mit Phosphatase-Inhibitor Cocktail behandelt, über den Flag-Tag aufgereinigt, mittels 3xFlag-Peptid eluiert und anschließend 7% jeder Elution mit  $P^{32}$ -markiertem GC-Box Oligonukleotid inkubiert. Die Auftrennung erfolgte in einem nativen 4% PAA-Gel und Protein-DNA Komplexe wurden durch Autoradiographie detektiert.

weitere Deletion (HA-Flag-Sp2 (379-612)) hergestellt und getestet. Zum Vergleich wurden nun auch Kernextrakte verwendet (Abb. 3.1.6 D und E). Alle getesteten HA-Flag-Sp2 Deletionsmutanten banden im EMSA DNA, wobei ein gradueller Effekt beobachtet werden konnte und die Bindung mit zunehmender Verkürzung stärker wurde. Dabei machte es keinen Unterschied, ob ein Kernextrakt eingesetzt wurde oder über ein Flag-Epitop aufgereinigte Proteine.





**Abbildung 3.1.6: DNA-Bindung von HA-Flag-Sp2 Fusionsproteinen** **A. Schematische Darstellung der verwendeten HA-Flag-Sp2 Fusionsproteine** (hellblau: HA-Tag, blau: Flag-Tag, rot: glutaminreiche Regionen, schwarz: Zinkfinger). **B. Western Blot zur Kontrolle der Expression und der Aufreinigung mittels Flag-Tag.** Die angegebenen Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und HA-Flag-Fusionsproteine wurden mit einem αHA-Antikörper detektiert. **C. EMSA.** HA-Flag-Sp2 Fusionsproteine wurden in SL2 Zellen exprimiert, über den Flag-Tag aufgereinigt, mittels 3xFlag-Peptid eluiert und anschließend 7% (HA-Flag-Sp2 (400-612)) oder 0,7% Elution mit P<sup>32</sup>-markiertem GC-Box Oligonukleotid inkubiert. Die Auftrennung erfolgte in einem nativen 4% PAA-Gel und Protein-DNA Komplexe wurden durch Autoradiographie detektiert. **D. Western Blot zur Kontrolle der Expression und der Aufreinigung mittels Flag-Tag.** Die angegebenen Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und HA-Flag-Fusionsproteine wurden mit einem αHA-Antikörper detektiert. **E. EMSA.** HA-Flag-Sp2 Fusionsproteine wurden in SL2 Zellen exprimiert, über den Flag-Tag aufgereinigt, mittels 3xFlag-Peptid eluiert und anschließend je 7% Elution mit P<sup>32</sup>-markiertem GC-Box Oligonukleotid inkubiert. Zum Vergleich wurde jeweils 1 µl Kernextrakt der transfizierten SL2 Zellen verwendet. Die Auftrennung erfolgte in einem nativen 4% PAA-Gel und Protein-DNA Komplexe wurden durch

---

Autoradiographie detektiert (\* Bindung von im SL2-Kernextrakt enthaltenen Proteinen an das GC-Box Oligonukleotid).

Zusammen mit den Ergebnissen von Frank Baur (2005) legen diese Befunde die Vermutung nahe, dass es ein größerer Bereich ist, der die DNA-Bindung reguliert. Je mehr davon deletiert wird, desto stärker ist die DNA-Bindung.

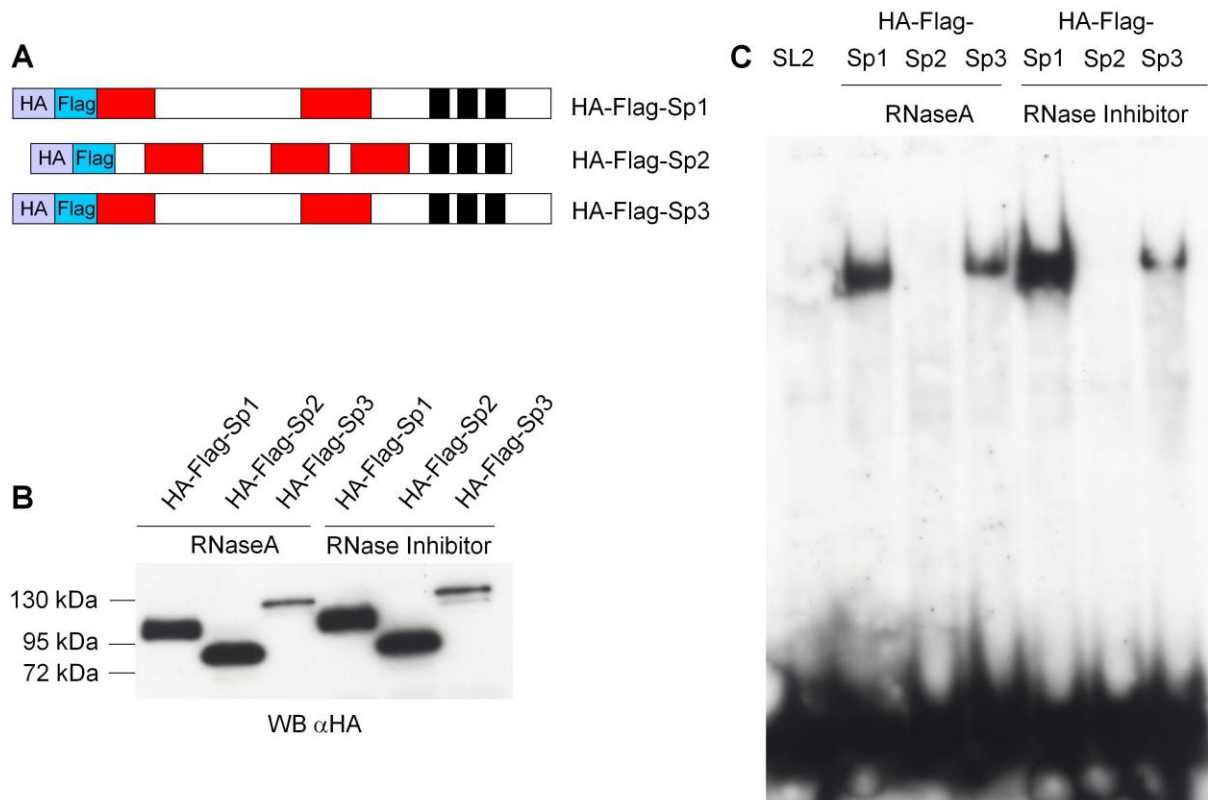
### **3.1.7 DNA-Bindung von HA-Flag-Sp Fusionsproteinen nach Behandlung mit RNaseA oder RNase Inhibitor**

Aufgrund der Beobachtung, dass die DNA-Bindung von Sp2 mit zunehmender N-terminaler Verkürzung graduell zunimmt, ist es sehr wahrscheinlich, dass ein größerer Bereich des Sp2 Proteins in die Regulation der DNA-Bindung involviert ist. Daher wäre es auch denkbar, dass eine regulatorische RNA beteiligt ist, die von mehreren Motiven im Sp2 Protein gebunden wird. Diese RNA könnte die DNA-Bindung entweder ermöglichen oder verhindern. Um diese beiden Möglichkeiten zu testen, wurden HA-Flag-Sp1, HA-Flag-Sp2 und HA-Flag-Sp3 in SL2 Zellen exprimiert und Kernextrakte entweder mit RNaseA oder mit RNase Inhibitor behandelt, bevor ein EMSA durchgeführt wurde. Während HA-Flag-Sp1 und HA-Flag-Sp3 unter beiden Bedingungen DNA binden, hat weder die Behandlung mit RNaseA noch mit RNase Inhibitor einen Einfluss auf die DNA-Bindung von Sp2 (Abb. 3.1.7). Es gibt also bisher keinen Hinweis auf die Beteiligung einer RNA an der Regulation der DNA-Bindung von Sp2.

### **3.1.8 DNA-Bindung von HA-Flag-Sp2 Fusionsproteinen nach internen Deletionen**

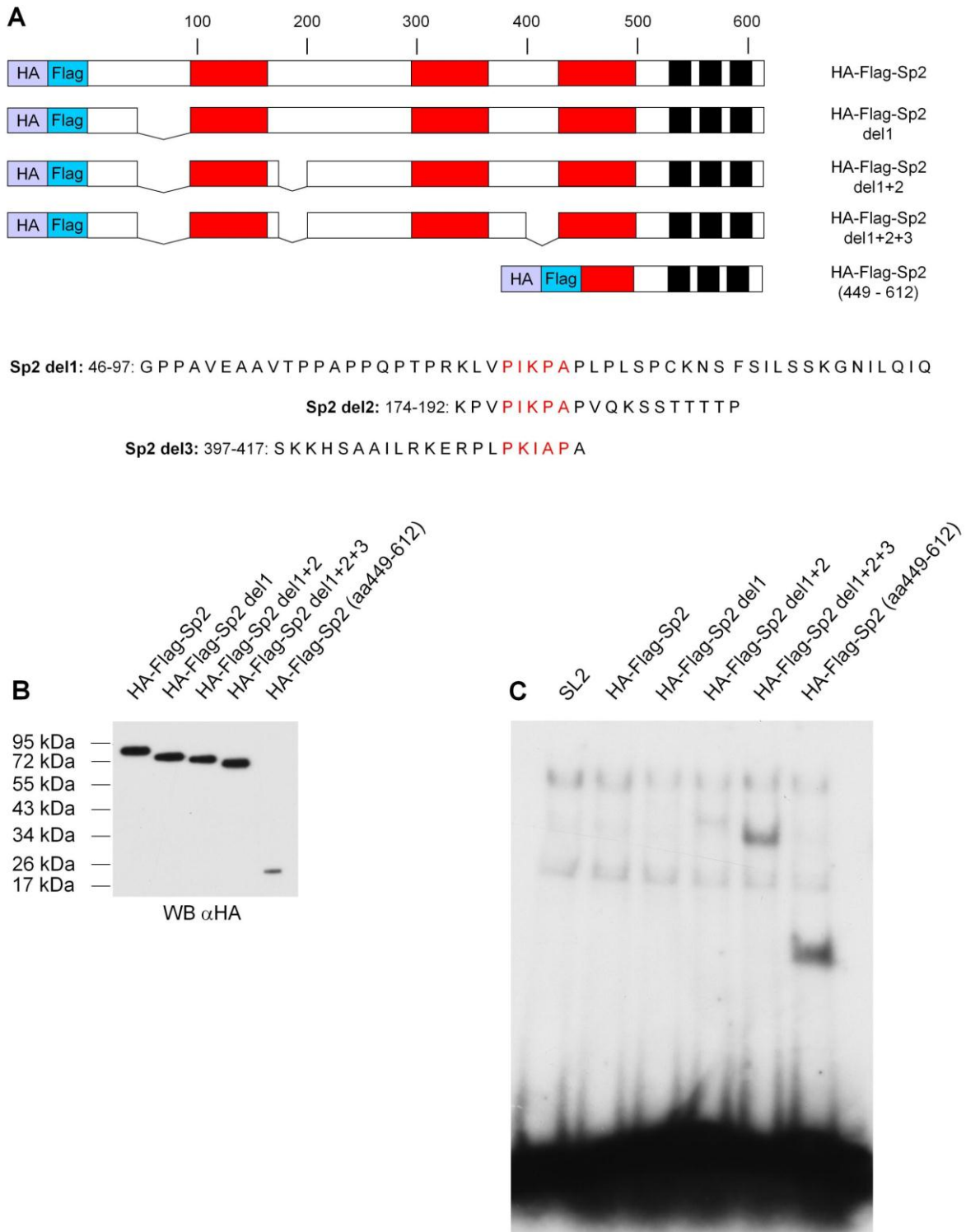
Da sowohl die oben aufgeführten Befunde als auch vorherige Ergebnisse (Baur 2005, Sadic 2009) zeigen, dass sich im Sp2 Protein sowohl im Bereich von Aminosäure 62-97 als auch zwischen Aminosäure 337 und 449 Regionen befinden, die die DNA-Bindung von Sp2 behindern, wurden die Aminosäuresequenzen dieser Bereiche genauer analysiert. Dabei fiel auf, dass sich in jedem dieser beiden Fragmente ein Prolin-Motiv befindet, nämlich PIKPA bzw. PKIAP (Abb. 3.1.8 A unten). Außerdem gibt es ein weiteres PIKPA-Motiv bei Aminosäure 174, das aber





**Abbildung 3.1.7 DNA-Bindung von HA-Flag-Sp Fusionsproteinen nach Behandlung mit RNaseA oder RNase-Inhibitor. A. Schematische Darstellung der verwendeten HA-Flag-Sp Fusionsproteine** (hellblau: HA-Tag, blau: Flag-Tag, rot: glutaminreiche Regionen, schwarz: Zinkfinger). **B. Western Blot zur Kontrolle der Expression der Fusionsproteine.** Jeweils 5 µl Kernextrakt wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und HA-Flag-Fusionsproteine wurden mit einem αHA-Antikörper detektiert. **C. EMSA.** HA-Flag-Sp1, HA-Flag-Sp2 und HA-Flag-Sp3 wurden in SL2 Zellen exprimiert, Kernextrakte mit RNaseA oder RNase-Inhibitor behandelt und anschließend je 1 µl Kernextrakt mit P<sup>32</sup>-markiertem GC-Box Oligonukleotid inkubiert. Die Auftrennung erfolgte in einem nativen 4% PAA-Gel und Protein-DNA Komplexe wurden durch Autoradiographie detektiert.

offenbar für sich allein zu keiner Beeinträchtigung der DNA-Bindung führt (vgl. Abb. 3.1.1.1, Gal4-Sp2 (113-224)). In HA-Flag-Sp2 wurden daher drei Deletionen eingeführt, um diese Motive und benachbarte, zum Teil ebenfalls konservierte Aminosäuren zu entfernen und die resultierenden Deletionsmutanten anschließend im EMSA zu testen. Folgende Bereiche wurden deletiert: AS 46-97, AS 174-192 und AS 397-412 (Abb. 3.1.8 A). Während Deletion 1 (46-97) für sich allein keinen Effekt hat, oder dieser unterhalb der Detektionsgrenze liegt, wird die DNA-Bindung mit jeder weiteren Deletion verstärkt (Abb. 3.1.8 B). Dabei ist anzumerken, dass die DNA-Bindung selbst nach Deletion aller drei Bereiche immer noch schwächer ist, als die der Positivkontrolle HA-Flag-Sp2 (449-612). Deutlich wird aber auch, dass es die Kombination aus mehreren Regionen ist, die die DNA-Bindung verhindert.



**Abbildung 3.1.8: DNA-Bindung von HA-Flag-Sp2 Deletionsmutanten. A. Schematische Darstellung der verwendeten HA-Flag-Sp2 Deletionsmutanten** (oben; hellblau: HA-Tag, blau: Flag-Tag, rot: glutaminreiche Regionen, schwarz: Zinkfinger). Wie unten dargestellt, wurden drei Regionen deletiert, die ein PIKP- bzw. PKIAP-Motiv (rot hervorgehoben) enthalten. **B. Western Blot zur Kontrolle der Expression der HA-Flag-Sp2 Deletionsmutanten.** Jeweils 5 µl Kernextrakt wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und HA-Flag-Fusionsproteine wurden mit einem αHA-Antikörper detektiert. **C. EMSA.** Die in A gezeigten HA-Flag-Sp2 Deletionsmutanten wurden in SL2 Zellen exprimiert und je 1 µl Kernextrakt wurde mit P<sup>32</sup>-



---

markiertem GC-Box Oligonukleotid inkubiert. Die Auftrennung erfolgte in einem nativen 4% PAA-Gel, die Detektion von Protein-DNA Komplexen durch Autoradiographie.

### **3.1.9 Zusammenfassung: DNA-Bindungseigenschaften von Sp2**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass volle-Länge Sp2 in EMSAs keine DNA bindet, während andere Sp-Faktoren unter den gleichen Bedingungen eine starke Bindung aufweisen. Fusioniert man N-terminale Fragmente mit der Gal4-DNA bindenden Domäne, binden diese DNA, weisen zum Teil aber einen „Schmier“ auf, der ein Hinweis auf Protein-Protein Interaktionen in diesen Bereichen sein könnte.

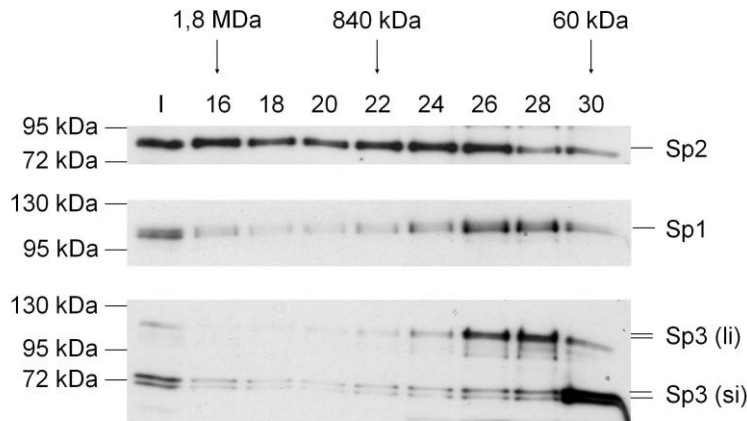
Auch nach der Aufreinigung über ein Flag-Epitop bindet Sp2 unter den getesteten Bedingungen nicht an DNA. Verkürzt man den N-Terminus oder entfernt Bereiche, die Prolin-reiche Motive und weitere konservierte Aminosäuren enthalten, ist eine graduelle Zunahme der DNA-Bindung nachweisbar. Sp2 scheint also Regionen zu enthalten, die unter den getesteten Bedingungen eine DNA-Bindung durch Sp2 inhibieren.

### **3.2 Größenfraktionierung mittels Gelchromatographie**

In EMSAs war beobachtet worden, dass die Zinkfinger von Sp2, nicht aber das volle-Länge Protein, DNA binden (Abb. 3.1.4 und Baur 2005). Zudem bindet das Fusionsprotein Gal4-Sp2 (6-471) DNA zwar, der Protein-DNA Komplex erscheint aber nicht als distinkte Bande, sondern „schmiert“ ins Gel (Abb. 3.1.1.1 und Baur 2005). Eine mögliche Erklärung für dieses ungewöhnliche Verhalten ist, dass sich in den eingesetzten Kernextrakten Proteine befinden, die mit Sp2 interagieren und daher dessen Laufgeschwindigkeit im Gel beeinflussen. Solche Protein-Protein Interaktionen könnten auch dafür verantwortlich sein, dass volle-Länge Sp2 unter den bisher untersuchten Bedingungen nicht an DNA bindet. Des Weiteren wurden drei Bereiche im Sp2 Protein identifiziert, die die DNA-Bindung inhibieren (vgl. 3.1.9). Um zu testen, ob es Proteine gibt, die mit Sp2 interagieren, wurde eine Superose 6 Säule verwendet und mittels Gelchromatographie unter nativen Bedingungen eine Größenfraktionierung durchgeführt. In der Superose 6 Säule wandern große Proteine oder Proteinkomplexe schneller, da sie die Poren im Säulenmaterial nicht passieren können. Kleinere Proteine wandern dagegen durch die Poren und legen somit einen weiteren Weg zurück. Daher durchlaufen sie die Säule daher langsamer als große Proteine oder Proteinkomplexe. In aufeinander folgenden Fraktionen befinden sich dann also Proteine oder Proteinkomplexe absteigender Größe. Interagiert das untersuchte Protein mit anderen Proteinen, wird man es in Fraktionen nachweisen können, die einem höheren Molekulargewicht entsprechen als dem des monomeren Proteins.

#### **3.2.1 Sp2 befindet sich in hochmolekularen Fraktionen**

Unter nativen Bedingungen wurden aus HEK293 Zellen Kernextrakte mit physiologischer Salzkonzentration (150 mM NaCl) hergestellt. Die Kernextrakte wurden zur Aufhebung von Protein-DNA Interaktionen mit Benzonase und Ethidiumbromid behandelt und über eine Superose 6 Säule fraktioniert. Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Im Gegensatz zu Sp1 und Sp3, die in den in etwa ihrem Molekulargewicht entsprechenden Fraktionen als deutlicher Peak auftreten, ist Sp2 über alle Fraktionen verteilt, ein Peak ist nicht erkennbar (Abb. 3.2.1.1).



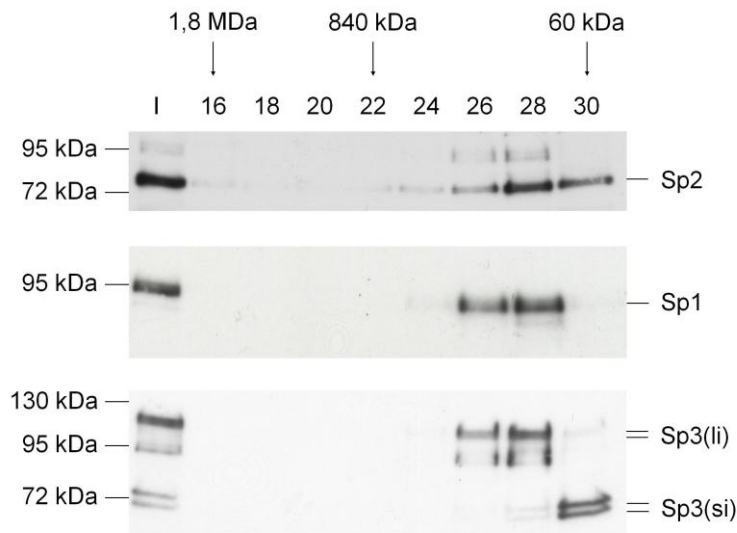
**Abbildung 3.2.1.1: Sp2 befindet sich nach Gelchromatographie unter physiologischen Bedingungen in hochmolekularen Fraktionen.** Aus HEK293 Zellen wurde unter physiologischen Bedingungen (150 mM NaCl) ein Kernextrakt hergestellt und 100  $\mu$ l (8  $\mu$ g/ $\mu$ l) davon wurden unter Verwendung einer Superose 6 Säule fraktioniert (Säulenpuffer mit 175 mM NaCl, Flussrate 0,2 ml/min). Die Fraktionen wurden anschließend ankonzentriert. 50% jeder Fraktion (16-30) sowie 20  $\mu$ g Kernextrakt als Input-Kontrolle (I) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Sp2, Sp1 und Sp3 (li= lange Isoformen, si= kurze Isoformen) wurden schließlich nacheinander mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen ( $\alpha$ Sp2 K-20 (Santa Cruz),  $\alpha$ Sp1 (Upstate),  $\alpha$ Sp3 D-20 (Santa Cruz)).

Dieser Befund lässt darauf schließen, dass Sp2 mit anderen Proteinen interagiert.

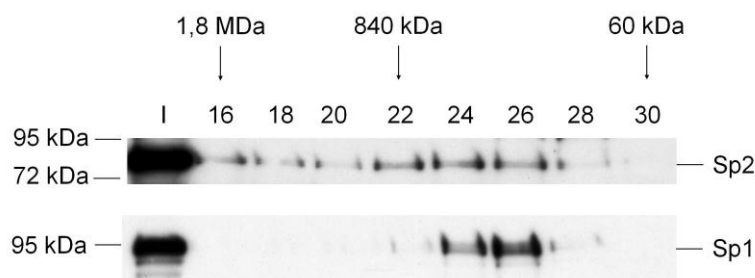
Um die Stabilität dieser Interaktionen zu testen, wurden dann, ebenfalls unter nativen Bedingungen, Kernextrakte mit einer höheren Salzkonzentration (420 mM NaCl) hergestellt und nach Zugabe von Ethidiumbromid mittels Säulenchromatographie fraktioniert. Unter diesen Bedingungen verhält sich Sp2 genauso wie Sp1 und Sp3 und durchläuft die Säule überwiegend als Monomer (Abb. 3.2.1.2). Die von Sp2 eingegangenen Protein-Protein-Interaktionen sind also nicht stabil.

Da Kernextrakte für EMSAs mit 420 mM NaCl hergestellt und für die DNA-Protein Bindungsreaktion auf 145 mM NaCl/KCl eingestellt werden, stellte sich nun die Frage, ob es möglich ist, dass Sp2 unter den in EMSAs vorliegenden Bedingungen mit anderen Proteinen interagiert. Daher wurde aus HEK293 Zellen ein Hochsalz-Kernextrakt hergestellt, in EMSA-Bindungspuffer auf eine Salzkonzentration von 145 mM eingestellt und für 20 min auf Eis inkubiert. Die so behandelte Probe wurde dann über eine Superose 6 Säule aufgetrennt und die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Western Blot analysiert. Im Gegensatz zu Sp1 findet man Sp2 unter diesen Bedingungen zu einem großen Teil in höhermolekularen Fraktionen (Abb. 3.2.1.3). Die durch die erhöhte Salzkonzentration aufgehobenen Protein-Protein-Interaktionen

können also nach Reduktion der Salzkonzentration offenbar wieder eingegangen werden.



**Abbildung 3.2.1.2: Sp2 befindet sich nach Gelchromatographie unter Hochsalz-Bedingungen in niedermolekularen Fraktionen.** Aus HEK293 Zellen wurde unter Hochsalz-Bedingungen (420 mM NaCl) ein Kernextrakt hergestellt und 100  $\mu$ l (8  $\mu$ g/ $\mu$ l) davon wurden unter Verwendung einer Superose 6 Säule fraktioniert (Säulenpuffer mit 175 mM NaCl, Flussrate 0,2 ml/min). Die Fraktionen wurden anschließend ankonzentriert. 50% jeder Fraktion (16-30) sowie 20  $\mu$ g Kernextrakt als Input-Kontrolle (I) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Sp2, Sp1 und Sp3 (li= lange Isoformen, si= kurze Isoformen) wurden schließlich nacheinander mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen ( $\alpha$ Sp2 K-20 (Santa Cruz),  $\alpha$ Sp1 (Upstate),  $\alpha$ Sp3 D-20 (Santa Cruz)).

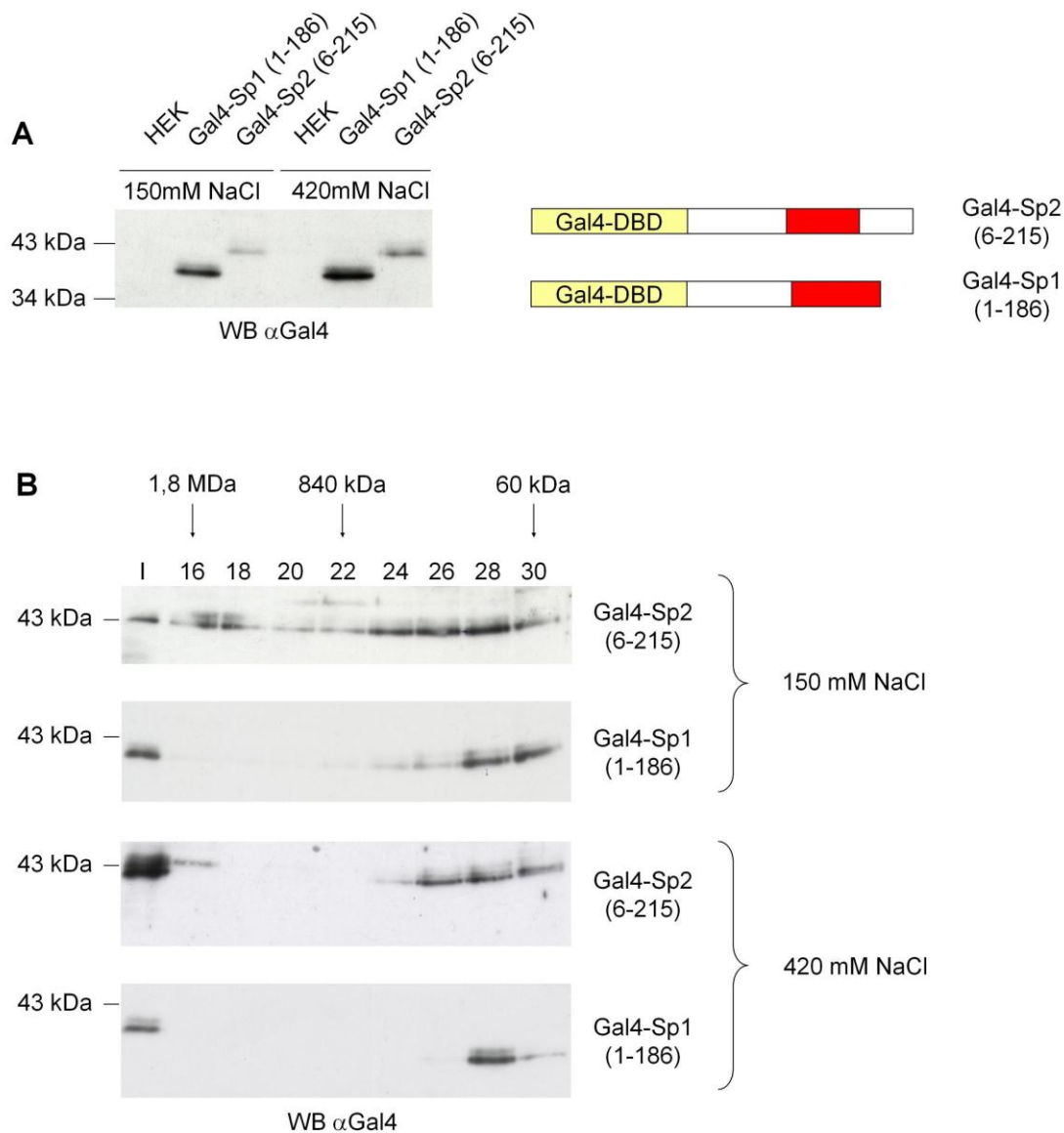


**Abbildung 3.2.1.3: Sp2 befindet sich nach Gelchromatographie unter EMSA-Bedingungen in hochmolekularen Fraktionen** Aus HEK293 Zellen wurde unter Hochsalz-Bedingungen (420 mM NaCl) ein Kernextrakt hergestellt und anschließend in EMSA-Bindungspuffer auf eine Salzkonzentration von 145 mM (NaCl und KCl) eingestellt. 200  $\mu$ l Extrakt (0,625  $\mu$ g/ $\mu$ l Protein) wurden unter Verwendung einer Superose 6 Säule fraktioniert (Säulenpuffer mit 175 mM NaCl, Flussrate 0,2 ml/min). Die Fraktionen wurden anschließend ankonzentriert. 50% jeder Fraktion (16-30) sowie 20  $\mu$ g Kernextrakt als Input-Kontrolle (I) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Sp2 und Sp1 wurden schließlich nacheinander mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen ( $\alpha$ Sp2 K-20 (Santa Cruz),  $\alpha$ Sp1 (Upstate)).

---

### **3.2.2 Größenfraktionierung von Gal4-Sp2 (6-215)**

Da der Effekt des „Schmierens“ im EMSA mit Gal4-Sp2 Fusionsproteinen beobachtet worden war, stellte sich die Frage, wie sich ein solches Fusionsprotein in der Säulenchromatographie verhalten würde. Daher wurden HEK293 Zellen mit Expressionsvektoren für Gal4-Sp2 (6-215) oder Gal4-Sp1 (1-186) transfiziert und daraus Kernextrakte hergestellt, die dann mittels Superose 6 Säule analysiert wurden. Auch Gal4-Sp2 (6-215) findet man unter physiologischer Salzkonzentration in eher hochmolekularen Fraktionen, Gal4-Sp1 (1-186) nicht. Dieser Effekt ist durch Erhöhung der Salzkonzentration im Kernextrakt auf 420 mM NaCl reversibel (Abb. 3.2.2).

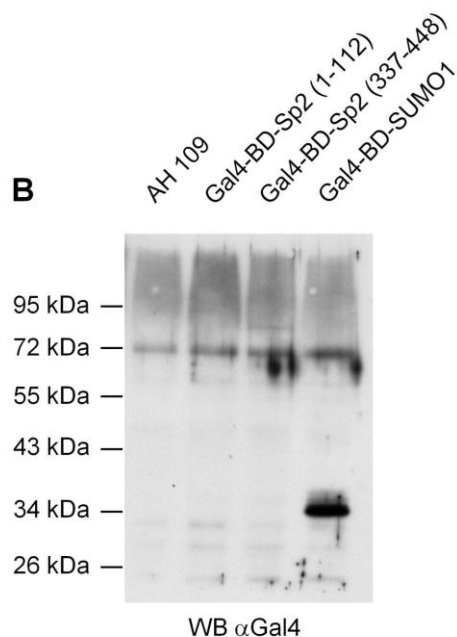
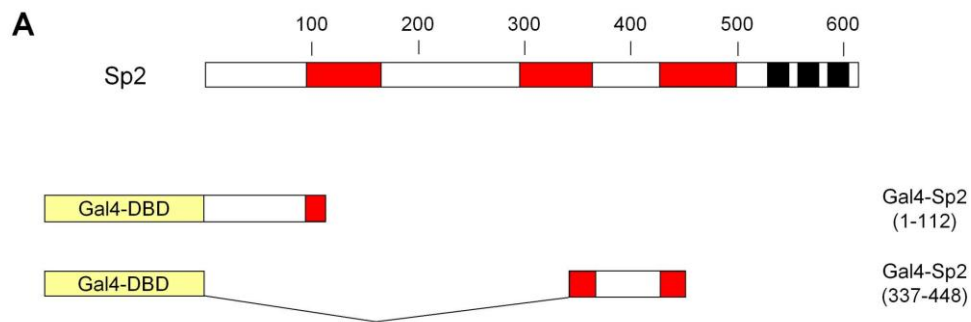


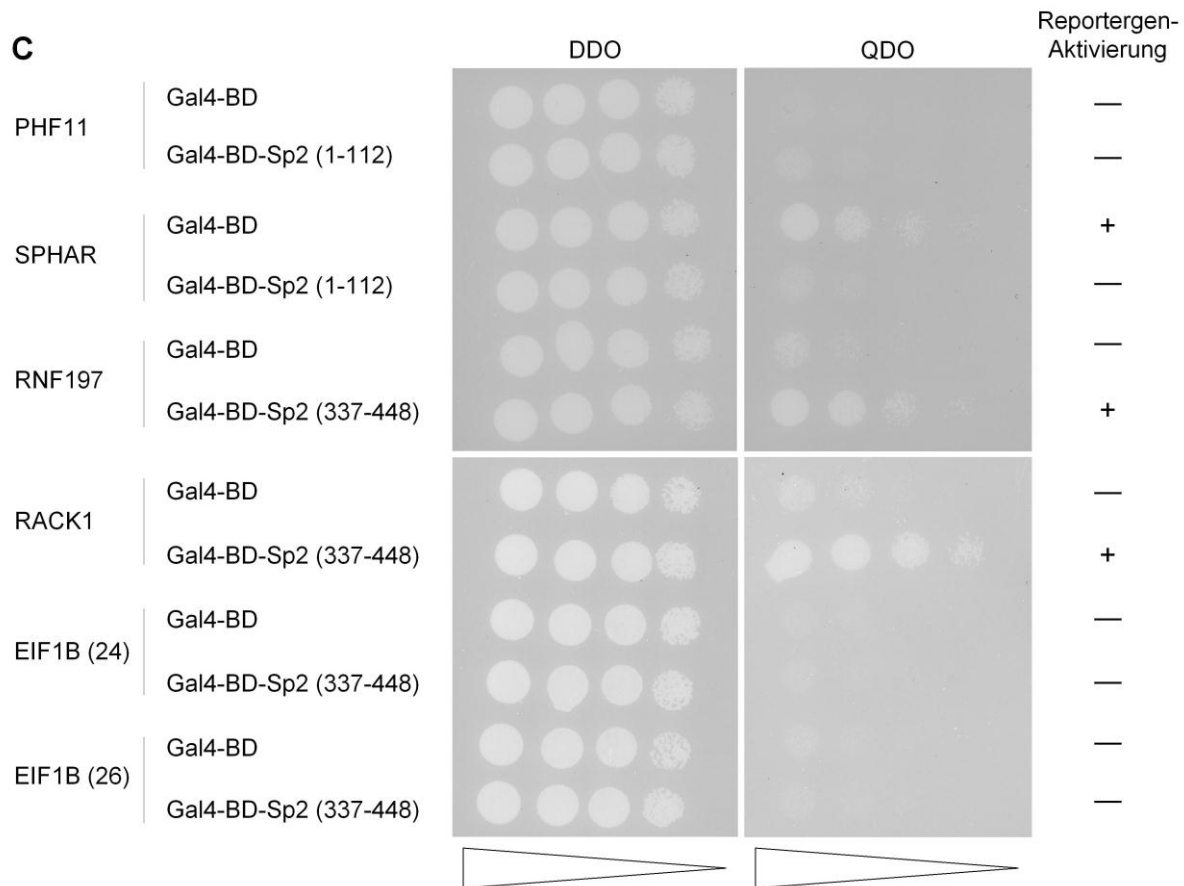
**Abbildung 3.2.2: Größenfraktionierung von Gal4-Sp2 (6-215) und Gal4-Sp1 (1-186).** **A. Western Blot zur Expressionskontrolle.** HEK293 Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für Gal4-Sp2 (6-215) und Gal4-Sp1 (1-186) transfiziert. 42 Stunden nach der Transfektion wurden Kernextrakte (150 mM NaCl und 420 mM NaCl) hergestellt und die Expression der Fusionsproteine mittels Western Blot kontrolliert. Dazu wurden je 20 µg Kernextrakt durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und Gal4-Fusionsproteine mit einem αGal4-BD Antikörper detektiert. **B. Western Blot nach Größenfraktionierung.** Je 100 µl Kernextrakt wurden mittels Superose 6 Säule fraktioniert (Säulenpuffer mit 175 mM NaCl, Flussrate 0,2 ml/min). Die Fraktionen wurden anschließend ankonzentriert, 50% jeder Fraktion (16-30) sowie 20 µg Kernextrakt als Input-Kontrolle (I) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Gal4-Fusionsproteine wurden mit einem αGal4-BD Antikörper (Babco) nachgewiesen.

### 3.3 Hefe-zwei-Hybrid System

Nachdem die Größenfraktionierung mittels Superose 6 Säule ergeben hatte, dass Sp2 sehr wahrscheinlich mit anderen Proteinen interagiert, sollten diese Interaktionspartner durch Verwendung eines Hefe-zwei-Hybrid Systems (*yeast-two-hybrid*; Y2H) identifiziert werden. Ausgewählt wurden die beiden Regionen im Sp2 Protein (1-112 und 337-448), die nach Fusion an die Sp2-Zinkfinger im EMSA keine oder sehr schwache DNA-Bindung zeigen (Sadic 2009) bzw. nach Fusion an die Gal4-BD ein ungewöhnliches Laufverhalten aufweisen (vgl. Abb. 3.1.1.1).

Um das System zu etablieren, mussten zunächst Expressionsplasmide für Gal4-BD-Sp2 (1-112) und (337-448) Fusionsproteine (Abb. 3.3.1 A) hergestellt und in der Hefe auf Proteinexpression überprüft werden. Getestet wurden Konstrukte auf Basis der Vektoren pGBKT7 und pFBT9. Mit keinem der Vektoren war im Western Blot die





**Abbildung 3.3.1: Hefe-zwei-Hybrid Experiment zur Identifizierung von Interaktionspartnern des Sp2 Proteins. A. Schematische Darstellung der verwendeten Gal4-BD-Sp2 Fusionsproteine.** An die Gal4-DNA bindende Domäne wurden die Aminosäuren 1-112 oder 337-448 angehängt und diese Fusionsproteine eingesetzt, um in einer humanen cDNA Bibliothek (Mate & Plate™ Library – Universal Human (Normalized), Clontech) nach Interaktionspartnern von Sp2 zu suchen. **B. Expressionskontrolle von Gal4-BD Fusionsproteinen in Hefe.** Die in A dargestellten Gal4-BD-Sp2 Fusionsproteine wurden in den Vektor pFBT9 kloniert und in Hefezellen (AH109) transformiert. Als Kontrolle diente pFBT9-SUMO1, ein Expressionsvektor für ein Gal4-BD-SUMO1 Fusionsprotein. Gesamtzellextrakte wurden hergestellt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die im Gel enthaltenen Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion von Gal4-B-Fusionsproteinen erfolgte mit einem  $\alpha$ Gal4-BD Antikörper (Babco). **C. Überprüfung von identifizierten Interaktionen durch Kotransformation in Hefe.** Gal4-BD, Gal4-BD-Sp2 (1-112) oder Gal4-BD-Sp2 (337-448) wurden zusammen mit den im Hefe-zwei-Hybrid Experiment isolierten potentiellen Interaktionspartnern in Hefezellen des Stammes AH109 transformiert und durch Auftropfen auf QDO-Medium auf Reportergen-Aktivierung getestet. Aufgetropft wurden jeweils 10  $\mu$ l einer Verdünnungsreihe (1:5) mit 10.000, 2.000, 400 und 80 Zellen/ $\mu$ l. Das DDO-Medium dient als Wachstumskontrolle unter Bedingungen, unter denen nur auf das Vorhandensein beider Vektoren (pFBT9 und pGADT7-RecAB) selektioniert wird, nicht aber auf Interaktion.



Expression von Gal4-Sp2 (1-112 ) oder (337-448) nachweisbar (Daten nicht gezeigt und Abb. 3.3.1 B). Allerdings war der Nachweis von Gal4-BD-SUMO1 nach Transformation von pFBT9-SUMO1 möglich, so dass angenommen wurde, dass das Expressionsniveau der Fusionsproteine zu gering für den Nachweis mittels Western Blot war oder andere unbekannte Gründe eine Detektion verhinderten. Allerdings konnte auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Gal4-BD-Sp2 Fusionsproteine nicht exprimiert wurden.

Durch Mating von Hefezellen des Stammes AH109, die mit pFBT9-Sp2 (1-112) oder pFBT9-Sp2 (337-448) transformiert worden waren, mit Zellen des Stammes Y187, die eine humane, universelle cDNA-Bibliothek enthielten, wurde Diploide hergestellt und auf Selektionsmedium (TDO/X- $\alpha$ -Gal) ausplattiert. Kolonien, die unter diesen Bedingungen wuchsen, wurden auf stringenter selektierendes Medium (QDO/X- $\alpha$ -Gal) übertragen und bei Wachstum erneut auf QDO/X- $\alpha$ -Gal überstrichen. So wurden 37 Klone identifiziert, die mit Gal4-BD-Sp2 (1-112) interagieren (Tabelle 3.3 a), und 7 Klone, die mit Gal4-BD-Sp2 (337-448) interagierten (Tabelle 3.3 b). Mit diesen Klonen wurde zunächst eine Kolonie-PCR durchgeführt, bei der die im Bibliotheksvektor pGADT7RecAB enthaltenen Inserts amplifiziert wurden. Die PCR-Produkte wurden anschließend sequenziert und durch Abgleich der Nukleotidsequenzen mit einer Datenbank (*Basic Local Alignment Search Tool*, BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) identifiziert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 3.3 a (Gal4-BD-Sp2 (1-112)) und Tabelle 3.3 b (Gal4-BD-Sp2 (337-448)) aufgeführt. Unter den Treffern für Gal4-BD-Sp2 (1-112) waren sieben Sequenzen, die humanen Chromosomen, zugeordnet werden konnten, aber keiner bekannten mRNA. Des Weiteren gab es 18 Sequenzen, die sich in der 3'untranslatierten Region einer mRNA befanden, und 13 Sequenzen, die in einer kodierenden Region lokalisiert waren.

Unter den 13 Sequenzen, die sich in der kodierenden Region einer mRNA befanden, waren sechs, die für Proteine kodieren, die sich nicht im Zellkern befinden (zwei mal Succinatdehydrogenase B (SDHB), Komplement Komponente 1QA (C1QA), Tetratricopeptid repeat Domäne 19 (TTC19) und zwei mal Neuropilin 1 (NRP1)) sowie vier Sequenzen, die für Kernproteine kodieren (Zinkfinger Protein 350 (ZNF350), Ring Finger Protein 2 (RNF2), PHD Finger Protein 11 (PHF11) und S-Phase Response (SPHAR)). Bei den übrigen drei Sequenzen handelte es sich um

Tabelle 3.3 a: Sequenzierungsergebnisse der unter Verwendung von Gal4-BD-Sp2(1-112) mittels Hefe-zwei-Hybrid aus einer mRNA-Bibliothek isolierten Plasmide

Klon	Accession Nr.	Name	Lokalisation des amplifizierten Fragments
1	NM_173569.3	Homo sapiens ubinuclein 2 (UBN2), mRNA	3'UTR
2	NT_011520.12	Homo sapiens chromosome 22 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly	
9	NM_006837.2	Homo sapiens COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5 (Arabidopsis) (COPS5),	CDS
11	NM_003000.2	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (lp) (SDHB)	CDS
16	NM_003000.2	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (lp) (SDHB)	CDS
17	NM_032352.3	Homo sapiens breast cancer metastasis-suppressor 1-like (BRMS1L)	3'UTR
18	NM_005112.4	Homo sapiens WD repeat domain 1 (WDR1), transcript variant 2	3'UTR
19	NM_021632.3	Homo sapiens zinc finger protein 350 (ZNF350)	CDS
20	NM_015991.2	Homo sapiens complement component 1, q subcomponent, A chain (C1QA)	CDS
21	NM_007212.3	Homo sapiens ring finger protein 2 (RNF2)	CDS
24	NM_001134759.1	Homo sapiens crystallin, zeta (quinone reductase) (CRYZ), transcript variant 4	3'UTR
31	NM_031935.2	Homo sapiens hemicentin 1 (HMCN1)	3'UTR
32	NM_006837.2	Homo sapiens COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5 (Arabidopsis) (COPS5),	CDS
34	NM_005239.4	Homo sapiens v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian) (ETS2)	3'UTR
38	NM_032352.3	Homo sapiens breast cancer metastasis-suppressor 1-like (BRMS1L)	3'UTR
43	NT_010966.14	Homo sapiens chromosome 18 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly	
45	NM_001412.3	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked (EIF1AX)	3'UTR

51	NM_003916.3	Homo sapiens adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit (AP1S2)	3'UTR
52	NM_001412.3	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked (EIF1AX)	3'UTR
53	NM_017775.2	Homo sapiens tetratricopeptide repeat domain 19 (TTC19)	CDS + 3'UTR
66	NM_016078.4	Homo sapiens family with sequence similarity 18, member B (FAM18B)	3'UTR
70	NM_001024628.2	Homo sapiens neuropilin 1 (NRP1), transcript variant 2	CDS
77	NT_011669.17	Homo sapiens chromosome X genomic contig	
80	NM_001040444.1	Homo sapiens PHD finger protein 11 (PHF11), transcript variant 2	CDS + 3'UTR
88	NM_000035.3	Homo sapiens aldolase B, fructose-bisphosphate (ALDOB)	3'UTR
89	NW_001838218.2	Homo sapiens chromosome 15 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef),	
93	NM_006837.2	Homo sapiens COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5 (Arabidopsis) (COPS5),	CDS
95	NM_001077199.1	Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 12 (SFRS12),	3'UTR
97	NM_000495.3	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 5 (COL4A5)	3'UTR
134	NM_006542.3	Homo sapiens S-phase response (cyclin related) (SPHAR)	CDS
136	NM_001123385.1	Homo sapiens BCL6 corepressor (BCOR)	3'UTR
140	NM_001024628.2	Homo sapiens neuropilin 1 (NRP1)	CDS
149	NM_001165899.1	Homo sapiens phosphodiesterase 4D, cAMP-specific (PDE4D)	3'UTR
151	NT_007933.15	Homo sapiens chromosome 7 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly	
152	NT_022135.16	Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly	
154	NM_014860.1	Homo sapiens suppressor of Ty 7 (S. cerevisiae)-like (SUPT7L)	3'UTR
157	NM_014860.1	Homo sapiens suppressor of Ty 7 (S. cerevisiae)-like (SUPT7L)	3'UTR
172	NT_010194.17	Homo sapiens chromosome 15 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly	

Tabelle 3.3 b: Sequenzierungsergebnisse der unter Verwendung von Gal4-BD-Sp2(337-448) mittels Hefe-zwei-Hybrid aus einer mRNA-Bibliothek isolierten Plasmide

Klon	Accession Nr.	Name	Lokalisation des amplifizierten Fragments
5	NM_006568.2	Homo sapiens cell growth regulator with ring finger domain 1 (CGRRF1), RNF197	CDS
18	NR_003034.2	Homo sapiens septin 7 pseudogene (LOC441601), non-coding RNA	
23	NT_034772.6	Homo sapiens chromosome 5 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly	
24	NM_005875.2	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 1B (EIF1B)	5'UTR, CDS, 3'UTR
26	NM_005875.2	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 1B (EIF1B)	5'UTR, CDS, 3'UTR
27	NM_005875.2	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 1B (EIF1B)	5'UTR, CDS, 3'UTR
31	NM_006098.4	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1 (GNB2L1), RACK1	CDS

COPS5 (CSN5, JAB1), ein Protein, von dem bekannt ist, dass es mit der Gal4-DNA bindenden Domäne interagiert (Nordgard et al., 2001). Die Identifikation von COPS5 ist also ein starkes Indiz dafür, dass die Gal4-BD-Sp2 Fusionsproteine exprimiert werden, auch wenn sie im Western Blot nicht nachweisbar waren.

Für Gal4-BD-Sp2 (337-448) wurden sieben Kandidaten identifiziert. Darunter war eine Sequenz, die einer genomischen Sequenz, aber keiner bekannten mRNA zugeordnet werden konnte, eine nicht-kodierende RNA und fünf Treffer in einer kodierenden Sequenz (Ring Finger Protein 197 (RNF197), drei mal der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 1B (EIF1B) und Guanine nucleotide-binding protein subunit beta 2-like 1 (GNB2L1; Synonym: Receptor for Activated Protein Kinase C1 (RACK1), im Folgenden RACK1 genannt).

Um zu Überprüfen, ob diese Interaktionen spezifisch sind für Sp2 (1-112) und Sp2 (337-448), oder auch auftreten, wenn nur die Gal4-BD vorhanden ist, wurden die pGADT7-RecAB-Konstrukte für ZNF350, RNF2, PHF11, SPHAR, RNF197, EIF1B (zwei Klone: Treffer 24 und 26) und RACK1 aus der Hefe extrahiert und in Bakterien vermehrt. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde dann zusammen mit pFBT9, pFBT9-Sp2 (1-112) oder pFBT9-Sp2 (337-448) in Hefezellen des Stammes AH109 transformiert und auf Reporter-gen-Aktivierung getestet. Für ZNF350, RNF2 und

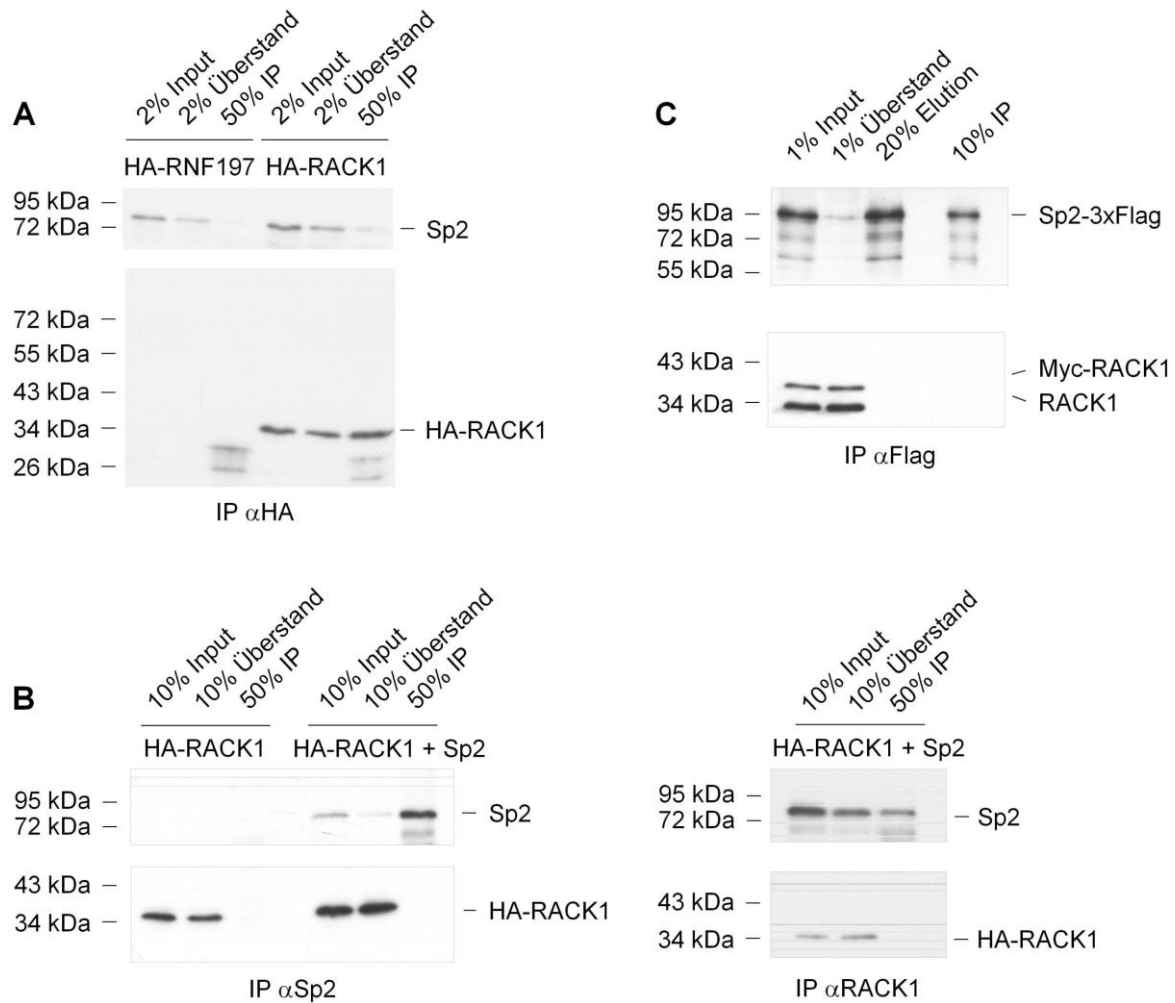
SPHAR war bereits in Anwesenheit der Gal4-BD allein eine Interaktion festzustellen, die entsprechend transformierten Hefezellen waren in der Lage, auf QDO-Platten zu wachsen, die Anwesenheit von Sp2 (1-112) war dafür nicht erforderlich. Im Gegensatz dazu interagierte PHF11 weder mit Gal4-BD noch mit Gal4-BD-Sp2 (1-112) (Daten nicht gezeigt und Abb. 3.3.1 C).

Sp2 (337-448)-spezifische Interaktionen wurden für RNF197 und RACK1 gefunden, während EIF1B in diesem Validierungsexperiment weder mit Gal4-BD allein noch mit Gal4-BD-Sp2 (337-448) interagierte (Abb. 3.3.1 C).

Um die Interaktionen zwischen Sp2 und RNF197 bzw. RACK1 mit einer anderen Methode zu überprüfen, wurde zunächst eine gekoppelte in-vitro Translation/Transkription mit den aus der Hefe isolierten pGADT7-RecAB Vektoren, die für RNF197 und RACK1 kodieren, und pCMV-Sport6-mSp2 durchgeführt. pGADT7-RecAB kodiert direkt vor dem Insert für ein HA-Epitop, so dass ein HA-Fusionsprotein exprimiert wird. Im Anschluss an die IVT wurde HA-RNF197 oder HA-RACK1 mit Sp2 inkubiert und die HA-Fusionsproteine mit einem  $\alpha$ HA-Antikörper immunpräzipitiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Western Blot. Ein Nachweis, dass Sp2 mit einem dieser beiden Proteine interagiert, war nicht möglich (Abb. 3.3.2 A). HA-RNF197 konnte mittels Western Blot nicht nachgewiesen werden. Dennoch wurde Sp2 präzipitiert, was darauf hin deutet, dass Sp2 unspezifisch an die Matrix (Protein G Sepharose) bindet. HA-RACK1 war im Western Blot deutlich nachweisbar und wurde präzipitiert, die Immunpräzipitation war allerdings nicht sehr effizient, da ein großer Teil des HA-RACK1 Fusionsproteins im Überstand nachgewiesen wurde. Sp2 wurde zusammen mit RACK1 präzipitiert, aber aufgrund der Beobachtung, dass Sp2 unspezifisch an die Matrix band, konnte weder gefolgert werden, dass Sp2 und HA-RACK1 interagieren, noch konnte die Interaktion ausgeschlossen werden (Abb. 3.3.2 A). Um die Effizienz der HA-RACK1 Immunpräzipitation zu erhöhen, wurde ein  $\alpha$ RACK1-Antikörper (Roche) verwendet. Parallel dazu wurde Sp2 mit einem affinitätsgereinigten  $\alpha$ Sp2-Antikörper präzipitiert (Abb. 3.3.2 B). Die Immunpräzipitation von Sp2 war effizient, es konnte aber keine Präzipitation von HA-RACK1 nachgewiesen werden. Eine Präzipitation von HA-RACK1 mit dem  $\alpha$ RACK1-Antikörper war nicht nachweisbar. Zudem wurde eine unspezifische Bindung von Sp2 an die Matrix beobachtet.

Schließlich wurden Myc-RACK1 und Sp2-3xFlag zusammen in HEK293 Zellen exprimiert, ein Gesamtzellextrakt hergestellt, eine Immunpräzipitation mit einem

$\alpha$ Flag-Antikörper durchgeführt und Sp2-3xFlag mit einem 3xFlag-Peptid von der Matrix eluiert. Sowohl Myc-RACK1 als auch endogenes RACK1 aus HEK293 Zellen befanden sich im Überstand, während Sp2 sowohl in der Elution als auch an der  $\alpha$ Flag-Matrix nachgewiesen wurde. Auch hier war somit kein Nachweis einer Interaktion möglich (Abb. 3.3.2 C).



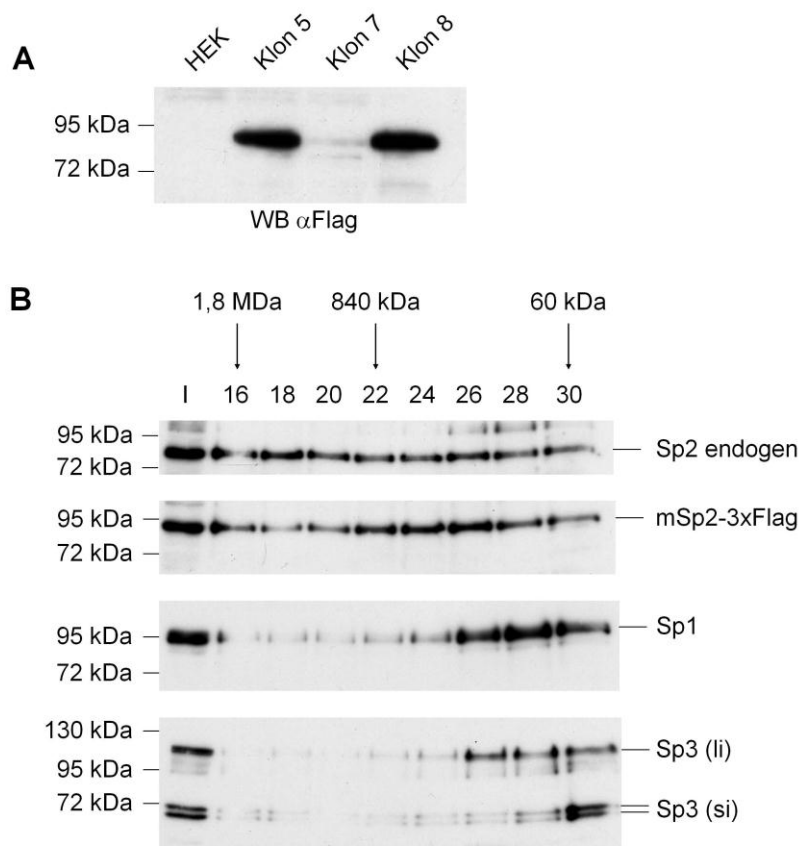
**Abbildung 3.3.2: Test auf Interaktion zwischen Sp2 und durch Hefe-zwei-Hybrid identifizierten potentiellen Interaktionspartnern. A. Immunpräzipitation nach IVT.** HA-RNF197, HA-RACK1 und Sp2 wurden durch gekoppelte in-vitro Transkription/Translation (IVT) hergestellt. Nach Inkubation von Sp2 mit HA-RNF197 oder HA-RACK1 wurde eine Immunpräzipitation (IP) mit einem  $\alpha$ HA-Antikörper durchgeführt und die in den Proben enthaltenen Proteine anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Übertragung auf eine PVDF-Membran erfolgte der Proteinnachweis mit spezifischen Antikörpern ( $\alpha$ HA (Roche),  $\alpha$ Sp2, affinitätsgereinigt). **B. Immunpräzipitation nach IVT.** HA-RACK1 und Sp2 wurden durch gekoppelte in-vitro Transkription/Translation (IVT) hergestellt. Nach Inkubation von Sp2 mit HA-RACK1 wurde eine Immunpräzipitation mit einem  $\alpha$ RACK1-Antikörper oder einem affinitätsgereinigten  $\alpha$ Sp2-Antikörper durchgeführt. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen ( $\alpha$ RACK1 (Santa Cruz),  $\alpha$ Sp2, affinitätsgereinigt). **C. Immunpräzipitation nach Überexpression von Myc-RACK1 und Sp2-3xFlag.** Myc-RACK1 und Sp2-3xFlag wurden in HEK293 Zellen exprimiert, Gesamtzellextrakt über  $\alpha$ Flag Agarose aufgereinigt und Sp2-3xFlag wurde mittels 3xFlag Peptid von der Matrix eluiert. Die in den Proben enthaltenen

---

Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Sp2-3-Flag und RACK1 wurden schließlich nacheinander mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen ( $\alpha$ Flag M2 (Sigma),  $\alpha$ RACK1 (Santa Cruz)).

### 3.4 Massenspektrometrie

Mittels Hefe-zwei-Hybrid System waren Proteine identifiziert worden, die möglicherweise mit Sp2 interagieren (vgl. 3.3 und Tabelle 3.3). Da es nicht möglich gewesen war, diese Interaktionen mittels Co-Immunpräzipitation nachzuweisen, sollten Proteine, die mit Sp2 interagieren, durch eine weitere Methode, die Massenspektrometrie, identifiziert werden. Dazu wurden HEK293 Zellen stabil mit einem Plasmid transfiziert, das für murines Sp2 mit einem C-terminalen 3xFlag-Tag kodiert. Anschließend wurden Einzelklone isoliert, auf Expression des Fusionsproteins getestet (Abb. 3.4.1 A) und das Verhalten von Sp2-3xFlag in der Gelchromatographie untersucht. In Abbildung 3.4.1 B werden nur die Ergebnisse gezeigt, die mit dem Einzelklon 5 erhalten wurden, Klon 7 und 8 verhielten sich vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Ebenso wie endogenes Sp2 fand sich Sp2-3xFlag in hochmolekularen Fraktionen, so dass man annehmen konnte, dass potentielle Protein-Protein Interaktionen durch den 3xFlag-Tag nicht gestört werden (Abb. 3.4.1 B).



**Abbildung 3.4.1: Testen einer stabilen HEK293 Zelllinie für die Expression von Sp2-3xFlag. A. Western Blot zur Expressionskontrolle.** HEK293 Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid für mSp2-3xFlag stabil transfiziert und Einzelklone wurden isoliert. Die Expression von mSp2-3xFlag wurde anschließend mittels Western Blot getestet. Dazu wurden je 20 µg Kernextrakt durch SDS-

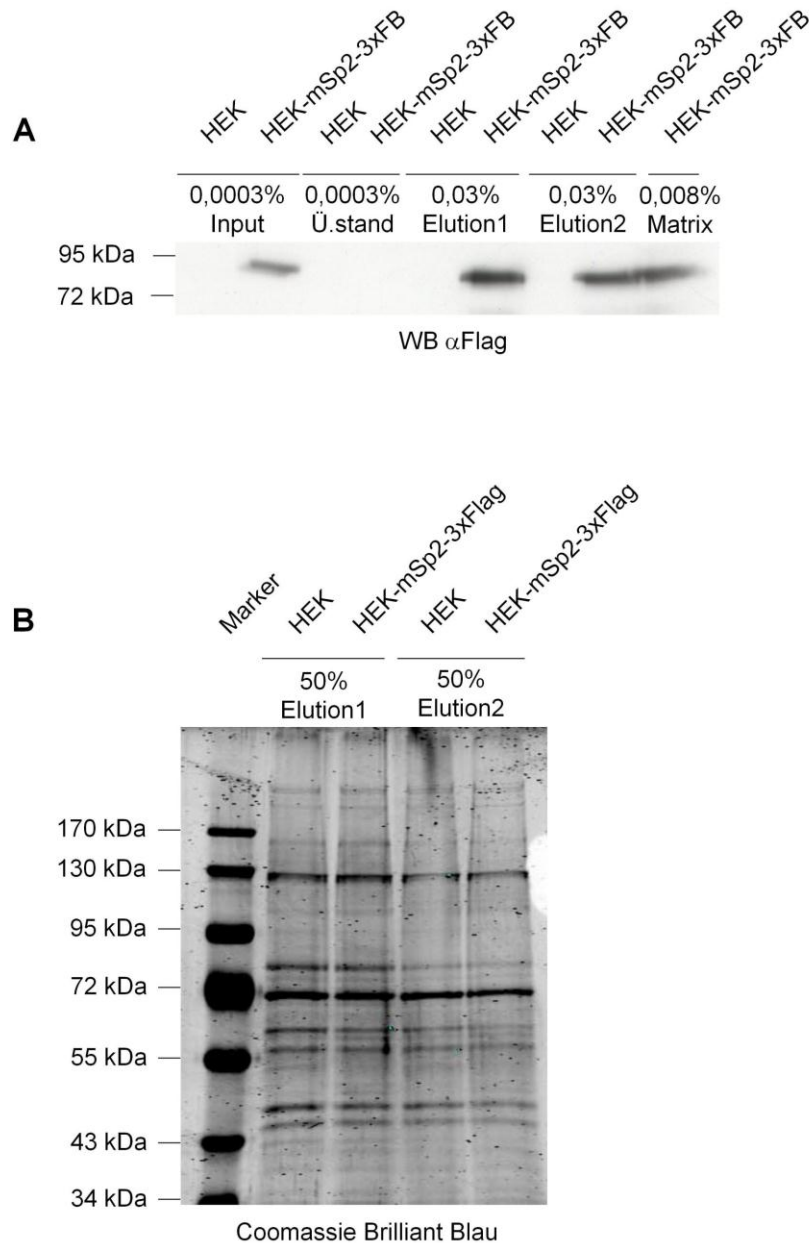


PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mSp2-3xFlag mit einem  $\alpha$ Flag-Antikörper nachgewiesen. **B. Western Blot nach Größenfraktionierung.** Aus der stabil transfizierten HEK293 Zelllinie 5 (vgl. A) wurde unter physiologische Bedingungen (150 mM NaCl) ein Kernextrakt hergestellt und über eine Superose 6 Säule fraktioniert (Säulenpuffer 175 mM NaCl, Flussrate 0,2 ml/min). Die Fraktionen wurden anschließend ankonzentriert. 50% jeder Fraktion (16-30) und 20  $\mu$ g Kernextrakt als Input-Kontrolle (I) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen ( $\alpha$ Sp2 K-20 (Santa Cruz),  $\alpha$ Flag M2 (Sigma),  $\alpha$ Sp1 (Upstate),  $\alpha$ Sp3 D-20 (Santa Cruz)).

Ein Einzelklon (Klon 5) wurde ausgewählt und zur Aufreinigung von Sp2 mittels Flag-Tag verwendet. Im Anschluss an die Aufreinigung wurde Sp2-3xFlag mit einem 3xFlag-Peptid von der Flag-Matrix eluiert und im SDS-PAA Gel analysiert. Insgesamt wurden drei Aufreinigungen durchgeführt. Zuerst wurde ein Gesamtzellextrakt (ZE) hergestellt, an die Flag-Matrix gekoppelt und Sp2-3xFlag wieder eluiert (Experiment 1). In einem zweiten Durchlauf wurden ein Gesamtzellextrakt (ZE) und ein Kernextrakt (KE) hergestellt, vor der Kopplung an die Matrix mit Benzonase behandelt, um Nukleinsäuren abzubauen, und anschließend aufgereinigt und eluiert (Experiment 2 ZE und KE). Die Kontrollen zu Experiment 1 sind in Abbildung 3.4.2 dargestellt, die Kontrollen zu Experiment 2 in Abbildung 3.4.3.

Die Proben wurden dann in der Massenspektrometrie-Einheit des Erasmus Medical Center (Rotterdam) analysiert. Zunächst erfolgte eine Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE. Die Gel-Spuren wurden dann in Scheiben geschnitten und jede Scheibe als einzelne Probe weiter aufbereitet. Es folgte ein Verdau mit Trypsin und die anschließende Analyse der Peptide mittels MALDI ToF. Die erhaltenen Daten wurden mit Protein-Datenbanken abgeglichen und zur weiteren Auswertung in Form von Microsoft Excel Dateien zur Verfügung gestellt.

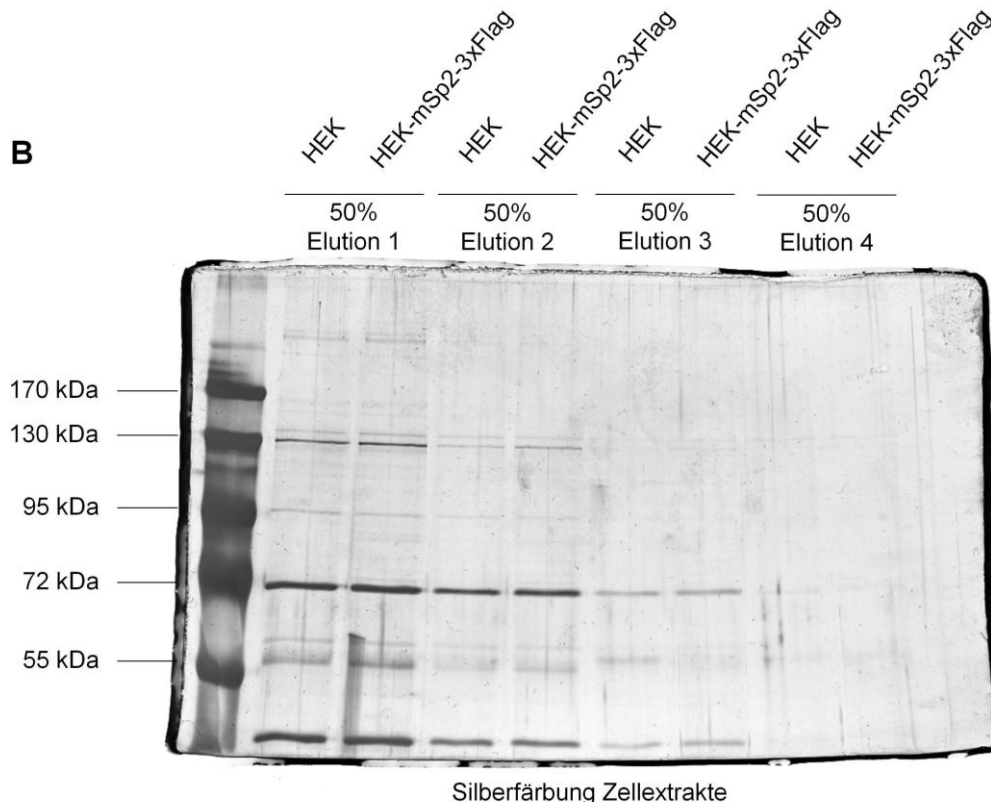
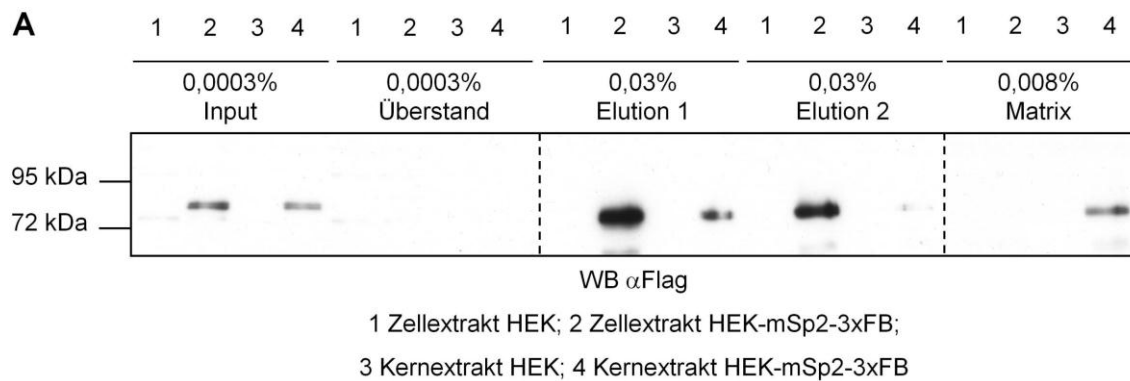
Insgesamt enthielten auch die Negativ-Kontrollen (HEK293-Lysate) sehr viele Proteine, allerdings gab es auch viele Treffer, die spezifisch für Sp2-3xFlag auftraten. So gab es insgesamt über beide Experimente und unter allen drei Bedingungen 279 Proteine, die in einer Probe spezifisch auftraten (Tabelle 3.4 a), und 31 Proteine, die unter zwei oder drei Bedingungen gefunden wurden (Tabelle 3.4 b). Allerdings waren die Mascot-Werte insgesamt relativ gering. Der Mascot-Wert ist ein Maß für die Zuverlässigkeit eines Treffers, d.h. er ermöglicht die statistische Unterscheidung zwischen spezifischen (signifikanten) Treffern und zufälligen Treffern. Die Grenze für Signifikanz liegt bei  $>95\%$ , also  $p=0,05$ . Ab welcher Höhe der Mascot-Wert signifikant ist, hängt von der Größe der durchsuchten Protein-Datenbank ab: je mehr Einträge die Datenbank enthält, desto höher muss der Mascot-Wert sein, um einen zufälligen

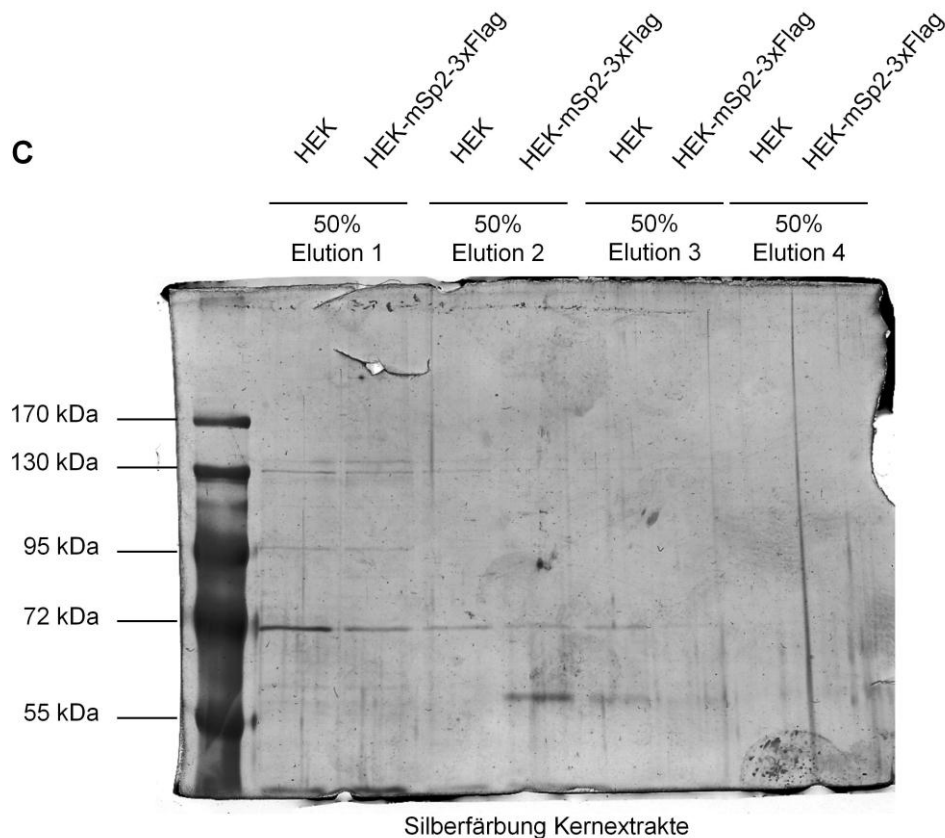


**Abbildung 3.4.2: Aufreinigung von Sp2-3xFlag und interagierenden Proteinen für die Analyse mittels Massenspektrometrie. A. Western Blot zur Kontrolle der Immunpräzipitation.** Aus der stabil transfizierte HEK-mSp2-3xFlag Linie 5 sowie untransfizierten HEK293 Zellen wurden jeweils 20 ml Zellextrakt hergestellt und mit  $\alpha$ Flag Agarose inkubiert. Die Matrix wurde gewaschen und Sp2-3xFlag mit einem 3xFlag Peptid eluiert. Anschließend wurden die Effizienz von Immunpräzipitation und Elution mittels Western Blot überprüft. Dazu wurden die angegebenen Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und Sp2-3xFlag mit einem  $\alpha$ Flag Antikörper detektiert. **B. Coomassie Brilliant Blau Färbung.** Zur Aufbereitung der Proben für die Massenspektrometrie wurden jeweils 150  $\mu$ l (50%) der 1. und 2. Elutionen ankonzentriert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt und die enthaltenen Proteine dadurch sichtbar gemacht.

Treffer mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% auszuschließen (www.matrixscience.com). Unter den hier verwendeten Bedingungen liegt die Signifikanzschwelle bei einem Mascot-Wert von 40.

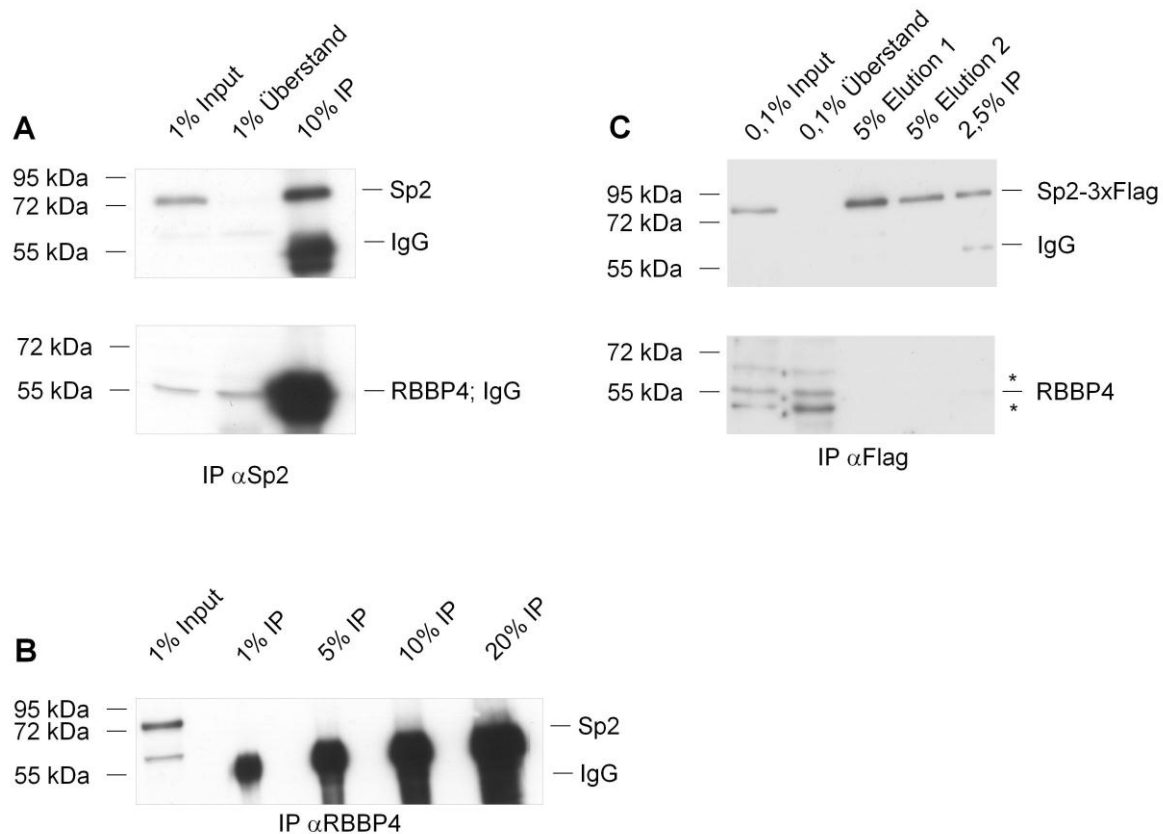
Aufgrund der großen Anzahl der Treffer, der Unterschiedlichkeit der drei verschiedenen Proben und der geringen Mascot-Werte war die Beurteilung der Qualität dieser Treffer problematisch, zumal es sich häufig um Proteine handelt, die man im Gegensatz zu Sp2 nicht im Zellkern findet und die scheinbar keinerlei Verbindung zur Regulation der Transkription oder verwandter Prozesse aufweisen. So handelt es sich beispielsweise bei den einzigen beiden Proteinen, die in allen drei Proben spezifisch für Sp2 auftraten, um CAD, ein Protein das vier enzymatische Reaktionen aus der Pyrimidin-Biosynthese katalysiert, und RCN1, ein Protein das vermutlich Calcium-abhängige Reaktionen im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums vermittelt (www.uniprot.org).





**Abbildung 3.4.3: Aufreinigung von Sp2-3xFlag und interagierenden Proteinen nach Benzonase-Behandlung für die Analyse mittels Massenspektrometrie. A. Western Blot zur Kontrolle der Immunpräzipitation.** Aus der stabil transfigierte HEK-mSp2-3xFlag Linie 5 sowie untransfigierten HEK293 Zellen wurden jeweils 20 ml Zellextrakt oder 15 ml Kernextrakt (150 mM NaCl) hergestellt, mit Benzonase behandelt und dann mit  $\alpha$ Flag Agarose inkubiert. Die Matrix wurde gewaschen und Sp2-3xFlag mit einem 3xFlag Peptid eluiert. Anschließend wurde die Effizienz von Immunpräzipitation und Elution mittels Western Blot überprüft. Dazu wurden die angegebenen Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und Sp2-3xFlag mit einem  $\alpha$ Flag Antikörper detektiert. **B. Silberfärbung nach Aufreinigung der Zellextrakte.** Zur Analyse der Proben vor der Massenspektrometrie wurden jeweils 150  $\mu$ l (50%) der 1. bis 4. Elutionen ankonzentriert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Silbernitrat gefärbt und die enthaltenen Proteine so sichtbar gemacht. **C. Silberfärbung nach Aufreinigung der Kernextrakte.** Zur Analyse der Proben vor der Massenspektrometrie wurden jeweils 150  $\mu$ l (50%) der 1. bis 4. Elutionen ankonzentriert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Silbernitrat gefärbt und die enthaltenen Proteine so sichtbar gemacht.

Aufgrund ihrer Verbindung zur Transkriptionskontrolle und weil beide sowohl im Zellextrakt des 1. Experiments als auch im Zellextrakt des 2. Experiments (also nach Benzonase-Behandlung) gefunden wurden, wurden E2F6 und RBBP4 ausgewählt und versucht, deren Interaktion mit Sp2 mittels Co-Immunpräzipitation zu validieren. Zunächst wurden Gesamtzellextrakte aus HEK293 Zellen hergestellt und eine Immunpräzipitation mit einem  $\alpha$ Sp2-Antikörper durchgeführt. E2F6 konnte aufgrund technischer Probleme mit dem  $\alpha$ E2F6-Antikörper, der unter allen getesteten



**Abbildung 3.4.4. Test auf Interaktion zwischen Sp2 und RBBP4. A. Immunpräzipitation von endogenem Sp2.** Aus HEK293 Zellen wurde ein Gesamtzellextrakt hergestellt und eine Immunpräzipitation mit einem  $\alpha$ Sp2-Antikörper (Santa Cruz) durchgeführt. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Anschließend erfolgte die Detektion mit spezifischen Antikörpern ( $\alpha$ Sp2 (Santa Cruz),  $\alpha$ RBBP4 (Santa Cruz)). Außer Sp2 (ca. 80 kDa) und RBBP4 (55 kDa) wurden auch die schweren Ketten der für die Immunpräzipitation eingesetzten Antikörper im Western Blot detektiert. Diese laufen auf der gleichen Höhe wie RBBP4 (55 kDa). **B. Immunpräzipitation von RBBP4.** Aus HEK293 Zellen wurde ein Gesamtzellextrakt hergestellt und eine Immunpräzipitation mit einem  $\alpha$ RBBP4-Antikörper (Santa Cruz) durchgeführt. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Anschließend erfolgte die Detektion von Sp2 mit einem affinitätsgereinigten  $\alpha$ Sp2-Antikörper. Außer Sp2 (80 kDa) wurden auch die schweren Ketten der für die Immunpräzipitation eingesetzten Antikörper im Western Blot detektiert. Diese laufen auf der gleichen Höhe wie RBBP4 (55 kDa). Daher konnte nicht kontrolliert werden, ob die Immunpräzipitation von RBBP4 erfolgreich war. **C. Immunpräzipitation von Sp2-3xFlag.** Aus mit Sp2-3xFlag stabil transfizierten HEK293 Zellen wurde ein Gesamtzellextrakt hergestellt und eine Immunpräzipitation mit einer  $\alpha$ Flag-Agarose (Sigma) durchgeführt. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Anschließend erfolgte die Detektion mit spezifischen Antikörpern ( $\alpha$ Flag M2 (Sigma),  $\alpha$ RBBP4 (Santa Cruz)). Außer Sp2-3xFlag (ca. 80 kDa) und RBBP4 (55 kDa) wurden auch die schweren Ketten der für die Immunpräzipitation eingesetzten Antikörper im Western Blot detektiert. Diese laufen auf der gleichen Höhe wie RBBP4 (55 kDa).

---

Bedingungen eine sehr starke Hintergrundfärbung hervorrief, nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da RBBP4 mit 55 kDa das gleiche Molekulargewicht hat, wie die schwere Kette des verwendeten Antikörpers, war es nicht möglich, zu beurteilen, ob RBBP4 mit Sp2 präzipitiert wurde (Abb. 3.4.4 A). Daraufhin wurde aus einem HEK293-Gesamtzellextrakt eine Immunpräzipitation mit dem  $\alpha$ RBBP4-Antikörper durchgeführt. Eine Interaktion mit Sp2 war auch hier nicht nachweisbar. Allerdings konnte die Effizienz der Präzipitation nicht getestet werden, da RBBP4 im SDS-PAA Gel auf der gleichen Höhe läuft wie die schwere Kette der verwendeten Antikörper (Abb. 3.4.4 B). Schließlich wurde ein Gesamtzellextrakt aus mit Sp2-3xFlag stabil transfizierten HEK293 Zellen hergestellt, über Flag-Matrix aufgereinigt und Sp2-3xFlag mit 3xFlag Peptid eluiert. RBBP4 wurde ausschließlich in Input und Überstand nachgewiesen, eine Interaktion mit Sp2 konnte auch hier nicht bestätigt werden (Abb. 3.4.4 C).

Tabelle 3.4 a: Mittels Co-Immunpräzipitation und anschließender massenspektrometrischer Analyse identifizierte potentielle Interaktionspartner von Sp2. Aufgelistet sind alle Proteine, die in einer der drei Proben identifiziert wurden (Zellextrakt: ZE, Kernextrakt: KE).

Genname	Accession Nr.	Proteinname	Mascot Score (ZE) 1. Experiment	Mascot Score (ZE) 2. Experiment	Mascot Score (KE) 2. Experiment
A1BG	gi 6912598	5'-nucleotidase, cytosolic II [Homo sapiens]	192		
ABLIM1	gi 55859664	Actin-binding LIM protein 1 isoform b [Homo sapiens]	45		
ACOT9	gi 12229616	Acyl-coenzyme A thioesterase 9 (Acyl-CoA thioesterase 9) (Acyl-CoA thioester hydrolase 9)	100		
ACTBL2	gi 62420949	Actin-like protein [Homo sapiens]			74
AP4B1	gi 193787550	Adaptor-related protein complex 4, beta 1 subunit		44	
ARL1	gi 4502227	ADP-ribosylation factor-like 1 [Homo sapiens]	59		
ARPC5L	gi 13569956	Actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like [Homo sapiens]		62	
ARRDC3	gi 32698736	Arrestin domain containing 3 [Homo sapiens]			39
ATP5B	gi 89574029	Mitochondrial ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting F1 complex beta subunit [Homo sapiens]		69	
ATP5C1	gi 4502227	ATP synthase gamma subunit precursor	75		
BAG2	gi 4757834	BCL2-associated athanogene 2 [Homo sapiens]		123	
BAT1	gi 2739119	BAT1 [Homo sapiens]	100		
BCAS2	gi 49457027	BCAS2 [Homo sapiens]			88
BOD1L	gi 87299628	Biorientation of chromosomes in cell			35

		division 1-like [Homo sapiens]			
C14orf156	gi 13654278	SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein [Homo sapiens]	70		
C17orf42	gi 34189703	C17orf42 protein [Homo sapiens]	54		
C1orf198	gi 14249478	Hypothetical protein LOC84886 isoform 1 [Homo sapiens]			34
C20orf11	gi 8923557	chromosome 20 open reading frame 11 [Homo sapiens]	103		
C20orf132	gi 34785927	Hypothetical protein LOC140699 isoform 2 [Homo sapiens]		44	
C6orf170	gi 21749955	Chromosome 6 open reading frame 170, isoform CRA_a [Homo sapiens]		42	
CBX1	gi 5803076	chromobox homolog 1 (HP1 beta homolog Drosophila ) [Homo sapiens]	72		
CBX3	gi 15082258	Chromobox homolog 3 [Homo sapiens]	168	70	
CCBL2	gi 21361809	Kynurenine aminotransferase III isoform 3 [Homo sapiens]		44	
CCDC19	gi 119573150	coiled-coil domain containing 19, isoform CRA_a [Homo sapiens]			44
CCDC88A	gi 50897852	Hook-related protein 1 [Homo sapiens]	240		
CCT3	gi 609308	Cytoplasmic chaperonin hTRiC5			35
CDC5L	gi 11067747	CDC5-like [Homo sapiens]			95
CEP170	gi 5734601	KARP-1-binding protein 1 (KAB1) [Homo sapiens]		47	
CHD4	gi 24047226	CHD4 protein [Homo sapiens]			77
CKAP5	gi 3121951	Cytoskeleton-associated protein 5 (Colonic and hepatic tumor over-expressed protein) (Ch-TOG protein)	1356		
CMAS	gi 16741605	CMAS protein [Homo sapiens]	57		
CNBP	gi 4827071	CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein [Homo sapiens]	77		



COL15A1	gi 461397	Alpha-1 type XV collagen		44	
CPSF4	gi 5729939	cleavage and polyadenylation specific factor 4, 30kDa isoform 1 [Homo sapiens]	78		
CREBBP	gi 194358868	CREBBP [Homo sapiens]			36
CROP	gi 28422640	CROP protein [Homo sapiens]	102		
CSDA	gi 181484	Cold shock domain protein A [Homo sapiens]		122	
DAP3	gi 4758118	Death associated protein 3, isoform CRA_a [Homo sapiens]			43
DARS	gi 45439306	aspartyl-tRNA synthetase [Homo sapiens]		54	
DDX47	gi 39644716	DDX47 protein [Homo sapiens]	35		
DECR1	gi 3687831	2,4-dienoyl-CoA reductase [Homo sapiens]	66		
DHX40	gi 31542729	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40 [Homo sapiens]			33
DNAH17	gi 172044714	dynein, axonemal, heavy chain 17		44	
DNAJA1	gi 219588	DnaJ protein homolog [Homo sapiens]	188		
DNAJA2	gi 2352904	Dnj3/Cpr3 [Homo sapiens]	93		
DNAJB4	gi 17388799	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6 isoform a [Homo sapiens]	50		
DSTN	gi 5802966	destrin isoform a [Homo sapiens]	61		
DUSP27	gi 122937243	Dual specificity phosphatase 27 (putative) [Homo sapiens]			36
DYNLL1	gi 4505813	dynein light chain 1 [Homo sapiens]	62		
EBN1BP2	gi 5803111	EBNA1 binding protein 2 [Homo sapiens]	98		
ECM1	gi 1488324	extracellular matrix protein 1			54
EEF1E1	gi 4758862	Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1 isoform 2 [Homo sapiens]		42	

EIF2S1	gi 4758256	Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa [Homo sapiens]		85	
EIF4A3	gi 7661920	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 3 [Homo sapiens]	68		
EP300	gi 31753089	EP300 protein [Homo sapiens]		35	
EP400	gi 209572748	E1A-binding protein p400			41
EPPK1	gi 37196760	Epiplakin [Homo sapiens]			41
ERLIN1	gi 62896519	SPFH domain family, member 1 variant [Homo sapiens]		55	
ETAA1	gi 37059814	ETAA16 protein [Homo sapiens]		43	
EXOSC1	gi 57209139	exosomal core protein CSL4 [Homo sapiens]	165		
EXOSC2	gi 19923403	exosome component 2 [Homo sapiens]	77		
EXOSC3	gi 7229638	exosome component 3 isoform 2 [Homo sapiens]	89		
EXOSC7	gi 119585135	exosome component 7 [Homo sapiens]	81		
EXOSC9	gi 77812670	Exosome component 9, isoform CRA_d [Homo sapiens]		59	
FANCI	gi 7022923	Fanconi anemia, complementation group I		64	
FHL1	gi 57208483	four and a half LIM domains 1 [Homo sapiens]	75		
FLJ37078	gi 158854042	Hypothetical protein LOC222183 [Homo sapiens]		51	
FLJ45950	gi 34534938	FLJ45950 protein			36
FRMPD1	gi 57997591	FERM and PDZ domain containing 1			39
FUS/TLS	gi 3582783	FUS/TLS protein [Homo sapiens]	54		
G3BP1	gi 75070772	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 (G3BP-1)	98		
G3BP2	gi 158256976	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2		49	

GAR1	gi 56566042	Nucleolar protein family A, member 1 [Homo sapiens]		50	
GOLGA3	gi 30089940	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 3 [Homo sapiens]	68		
GRIA3	gi 66347240	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3 [Homo sapiens]			68
hCG_1641229	gi 119631286	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C pseudogene			110
hCG_1988300	gi 119607256	HCG1988300, isoform CRA_b [Homo sapiens]			83
hCG1755809	gi 119613470	hCG1755809, isoform CRA_b [Homo sapiens]	327		
HDAC2	gi 71051977	HDAC2 protein [Homo sapiens]	112		
HDAC6	gi 13543430	HDAC6 protein [Homo sapiens]	57		
HNRNPA2B1	gi 14043072	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform B1 [Homo sapiens]			53
ID1	gi 457785	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein, isoform CRA_b [Homo sapiens]			44
IFI27L1	gi 119601959	Family with sequence similarity 14, member B, isoform CRA_a [Homo sapiens]			48
IGF2BP3	gi 30795212	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 [Homo sapiens]		68	
IGKV2	gi 10636525	Immunoglobulin kappa light chain variable region [Homo sapiens]			150
IGKV2D-29	gi 70798791	Immunoglobulin kappa light chain variable region [Homo sapiens]			39
IGVK2-28	gi 16076466	Immunoglobulin kappa chain variable region [Homo sapiens]			166

IKIP	gi 24233517	IKK interacting protein isoform 1 [Homo sapiens]	55		
IMMT	gi 48145703	inner membrane protein, mitochondrial (mitofilin)		46	
KDM5B	gi 6572291	Jumonji, AT rich interactive domain 1B (RBP2-like), isoform CRA_c [Homo sapiens]		43	
KHDRBS1	gi 608528	p62 ras-GAP associated phosphoprotein	45		
KIAA0564	gi 57863271	Hypothetical protein LOC23078 isoform a [Homo sapiens]			43
KIAA1409	gi 71891725	KIAA1409 protein [Homo sapiens]			65
KIF14	gi 71051763	KIF14 protein [Homo sapiens]	60		
KIF21B	gi 83582520	Kinesin-like protein KIF21B variant [Homo sapiens]		47	
LIMA1	gi 7705373	LIM domain and actin binding 1 isoform b [Homo sapiens]			148
LMNB1	gi 50415798	LMNB1 protein [Homo sapiens]	85		
LOC100126583	gi 34365085	Hypothetical protein [Homo sapiens]			72
LOC100128142	gi 169210857	PREDICTED: similar to RIKEN cDNA E130309D14 [Homo sapiens]		42	
LOC100129492	gi 169160654	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]			67
LOC100134504	gi 169170622	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]		378	
LOC388720	gi 88943644	PREDICTED: similar to ubiquitin [Homo sapiens]		83	
LOC728317	gi 113430177	PREDICTED: similar to Predicted gene, OTTMUSG00000017677 [Homo sapiens]			49

LOC741340	gi 114647215	PREDICTED: similar to 40S ribosomal protein S2 (S4) (LLRep3 protein) isoform 5 [Pan troglodytes]		296	
LRP2	gi 119631685	Low density lipoprotein-related protein 2 [Homo sapiens]			39
LUC7L	gi 8922297	LUC7-like isoform a [Homo sapiens]	197		
LUC7L2	gi 116812577	LUC7-like 2 [Homo sapiens]	96		
MAP1A	gi 1790878	Microtubule-associated protein 1a [Homo sapiens]		96	
MAT2B	gi 5174529	methionine adenosyltransferase II, alpha [Homo sapiens]	160		
MGST3	gi 55663118	microsomal glutathione S-transferase 3 [Homo sapiens]	74		
MKI67	gi 415819	antigen of the monoclonal antibody Ki-67 [Homo sapiens]			45
MLLT4	gi 430994	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4 [Homo sapiens]		46	
MOBKL1A	gi 27735029	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1A [Homo sapiens]	138		
MRE11A	gi 5031923	meiotic recombination 11 homolog A isoform 1 [Homo sapiens]			42
MRP28	gi 7661730	mitochondrial ribosomal protein S28 [Homo sapiens]	119		
MRPL22	gi 6841538	HSPC158 [Homo sapiens]	75		
MRPS16	gi 7705626	mitochondrial ribosomal protein S16 [Homo sapiens]	76		
MRPS17	gi 7705425	mitochondrial ribosomal protein S17 [Homo sapiens]	81		
MRPS23	gi 16554604	mitochondrial ribosomal protein S23 [Homo sapiens]	161		

MRPS6	gi 13620885	mitochondrial ribosomal protein S6 [Homo sapiens]	51		
MSI2	gi 31417000	MSI2 protein [Homo sapiens]	94		
MTSS1	gi 6539606	metastasis suppressor protein [Homo sapiens]			55
MUC16	gi 83367077	Mucin 16 [Homo sapiens]			36
MYH14	gi 116284394	myosin, heavy chain 14 isoform 2 [Homo sapiens]			141
MYH9	gi 12667788	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle [Homo sapiens]	468		
MYL6	gi 17986258	myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle isoform 1 [Homo sapiens]	89		
MYL9	gi 48145803	Myosin light chain 9			56
MYO1C	gi 45751608	Myosin IC [Homo sapiens]	105		
MYO5B	gi 122937345	myosin VB [Homo sapiens]		35	
MYO5C	gi 40674442	MYO5C protein [Homo sapiens]			35
MYO9B	gi 68533049	MYO9B variant protein [Homo sapiens]	45		
NCBP1	gi 4505343	nuclear cap binding protein subunit 1, 80kDa [Homo sapiens]	83		
NCKIPSD	gi 483915	ORF1 [Homo sapiens]	166		
ND5	gi 150022884	NADH dehydrogenase subunit 5 [Homo sapiens]		37	
NEB	gi 806562	Nebulin [Homo sapiens]			41
NEIL1	gi 119619662	Nei endonuclease VIII-like 1 (E. coli), isoform CRA_b [Homo sapiens]			59
NEK1	gi 109730323	NEK1 protein [Homo sapiens]			42
NEK2	gi 31807297	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2 variant [Homo sapiens]		58	
NINJ2	gi 39725946	Ninjurin 2 [Homo sapiens]		45	
NIP7	gi 6841580	HSPC180 [Homo sapiens]	70		

NOC4L	gi 13129068	nucleolar complex associated 4 homolog [Homo sapiens]	87		
NRAP	gi 34364818	nebulin-related anchoring protein			39
NUAK2	gi 13569922	NUAK family, SNF1-like kinase, 2 [Homo sapiens]	47		
NUFIP2	gi 32698730	Nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 2 [Homo sapiens]			44
OBSCN	gi 55666435	obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF [Homo sapiens]			48
P4HB	gi 211828150	Glutathione-insulin transhydrogenase (216 AA) [Homo sapiens]		35	
PAPD1	gi 21361704	PAP associated domain containing 1 [Homo sapiens]	73		
PARP1	gi 22902366	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1 [Homo sapiens]	38		
PDK3	gi 4885545	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 3 [Homo sapiens]	56		
PHB	gi 4505773	prohibitin [Homo sapiens]	74		
PLRG1	gi 18088489	PLRG1 protein [Homo sapiens]	201		
PLXNC1	gi 5032223	Plexin C1 [Homo sapiens]			59
POLR2H	gi 1017823	RNA polymerase II subunit	132		
POP7	gi 3249539	ribonuclease P protein subunit p20 [Homo sapiens]	83		
PPIH	gi 5454154	peptidylprolyl isomerase H [Homo sapiens]	58		
PPP2CB	gi 17149125	Protein phosphatase type 2A catalytic subunit [Homo sapiens]		56	
PPP2R1A	gi 47496627	PPP2R1A [Homo sapiens]		90	
PPP6C	gi 4506029	protein phosphatase 6, catalytic subunit	135		

		[Homo sapiens]			
PRPF4	gi 2853277	WD splicing factor Hprp4p [Homo sapiens]	113		
PSMA5	gi 54696300	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5 [Homo sapiens]	54		
PSMA7	gi 4092058	proteasome subunit HSPC [Homo sapiens]	60		
PSMD13	gi 3746882	26S proteasome subunit 11 [Homo sapiens]			49
PSMD2	gi 1060888	human 26S proteasome subunit p97 [Homo sapiens]	70		
PSMD8	gi 20978554	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 (26S proteasome regulatory subunit S14)	40		
PTK9	gi 49456431	TWF1 protein [Homo sapiens]		50	
PTPLAD1	gi 117168248	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1 [Homo sapiens]	98		
PYCRL	gi 62896929	Pyrroline-5-carboxylate reductase-like variant [Homo sapiens]		47	
QPCTL	gi 92110027	glutaminy-peptide cyclotransferase-like [Homo sapiens]	208		
RAC1	gi 190875	ras-like protein			40
RASSF5	gi 13279080	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5 [Homo sapiens]		34	
RB1CC1	gi 16040977	Rb1-inducible coiled coil protein [Homo sapiens]	112		
RBM14	gi 5454064	RNA binding motif protein 14 [Homo sapiens]	86		
RBM3	gi 5803137	RNA binding motif protein 3 [Homo sapiens]	46		



RBM38	gi 407421	SEB4B [Homo sapiens]	62		
RBM39	gi 4757926	RNA binding motif protein 39 isoform b [Homo sapiens]	274		
RBM42	gi 21594922	RBM42 protein [Homo sapiens]	42		
RBM8A	gi 4826972	RNA binding motif protein 8A [Homo sapiens]	70		
RCN2	gi 119619622	reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain [Homo sapiens]		144	
RFC5	gi 47115239	Replication factor C 5 isoform 1 [Homo sapiens]		48	
RIF1	gi 55418562	RIF1 [Homo sapiens]	683		
RNF2	gi 6005747	ring finger protein 2 [Homo sapiens]	237		
RNH1	gi 21361547	ribonuclease/angiogenin inhibitor [Homo sapiens]	67		
Rpl10a	gi 23491735	ribosomal protein L10a [Homo sapiens]		335	
RPL10P16	gi 41151097	ribosomal protein L10 pseudogene 16		128	
RPL14	gi 7513316	Ribosomal protein L14 - human		279	
RPL35	gi 6005860	Ribosomal protein L35 [Homo sapiens]		73	
RPL37A	gi 4506643	ribosomal protein L37a [Homo sapiens]		41	
RPL5	gi 14591909	ribosomal protein L5 [Homo sapiens]		393	
RPL8	gi 4506663	ribosomal protein L8 [Homo sapiens]		129	
RPLP2	gi 4506671	ribosomal protein P2 [Homo sapiens]	216		
RPS26P11	gi 74741611	40S ribosomal protein S26-like 1		86	
RPS28	gi 4506715	Ribosomal protein S28 [Homo sapiens]		43	
RPS29	gi 4506717	ribosomal protein S29 isoform 1 [Homo sapiens]	50		
RSL1D1	gi 33878601	RSL1D1 protein [Homo sapiens]	89		
S100A11	gi 5032057	S100 calcium binding protein A11 [Homo sapiens]			79
SAP130	gi 6006515	spliceosomal protein SAP 130 [Homo	2057		

		sapiens]			
SCLT1	gi 153791839	Hypothetical protein FLJ30655, isoform CRA_b [Homo sapiens]		41	
SCRIB	gi 18032008	Scribble [Homo sapiens]		44	
SCYL2	gi 47604944	SCY1-like 2 protein [Homo sapiens]		77	
SETBP1	gi 5478318	SET binding protein 1 [Homo sapiens]		45	
SFPQ	gi 4826998	splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated) [Homo sapiens]	65		
SFRS1	gi 5902076	Splicing factor, arginine/serine-rich 1 isoform 1 [Homo sapiens]		159	
SFRS4	gi 307438	splicing factor, arginine/serine-rich 4		34	
SFRS7	gi 72534660	Splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa, isoform CRA_a [Homo sapiens]		120	
SHPRH	gi 32480766	SNF2 histone linker PHD RING helicase [Homo sapiens]		50	
SKP1	gi 1583224	RNA polymerase II elongation factor	65		
SLC25A1	gi 21361114	Citrate transporter protein [Homo sapiens]		96	
SLC25A12	gi 75070778	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1 (Mitochondrial aspartate glutamate carrier 1) (Solute carrier family 25 member 12)	50		
SLC25A13	gi 7657581	solute carrier family 25, member 13 (citrin) [Homo sapiens]	50		
SLC25A3	gi 34783216	Solute carrier family 25 member 3 isoform b precursor [Homo sapiens]		146	
SLC25A4	gi 339920	ADP/ADT translocator protein		382	
SMC1A	gi 30581135	structural maintenance of chromosomes 1A [Homo sapiens]			51

SORL1	gi 4507157	Sortilin-related receptor containing LDLR class A repeats preproprotein [Homo sapiens]		206	
SORT1	gi 119576784	sortilin 1 [Homo sapiens]		40	
SPRR1A	gi 385225	small proline-rich protein 1 [Homo sapiens]			36
SPTBN2	gi 5902122	Beta-spectrin III [Homo sapiens]			106
SRFBP1	gi 16877732	Unnamed protein product [Homo sapiens]		66	
SRPK1	gi 47419936	SFRS protein kinase 1 [Homo sapiens]	98		
SRRM1	gi 23274133	Serine/arginine repetitive matrix 1 [Homo sapiens]			37
SSB	gi 337457	ribonucleoprotein La	203		
STAU1	gi 33875035	STAU1 protein [Homo sapiens]		54	
TAF15	gi 1373378	TAF15	73		
TBL2	gi 4704417	WS beta-transducin repeats protein [Homo sapiens]	169		
TFAM	gi 47115243	Transcription factor A, mitochondrial [Homo sapiens]		51	
THOC4	gi 55770864	THO complex 4 [Homo sapiens]		60	
THOC6	gi 13111899	THOC6 protein [Homo sapiens]	58		
TMCC1/TMCO1	gi 24308133	transmembrane and coiled-coil domains 1 [Homo sapiens]	57		
TMEM33	gi 224589127	Transmembrane protein 33 [Homo sapiens]		65	
TOP2	gi 292830	DNA topoisomerase II (EC 5.99.1.3)	178		
TPM3	gi 114155140	tropomyosin 3 isoform 1 [Homo sapiens]			104
TRIM24	gi 2267585	Transcription intermediary factor 1 [Homo sapiens]			43
TRIM3	gi 12407371	Tripartite motif protein TRIM3 isoform		44	

		beta [Homo sapiens]			
TRPM4	gi 15617229	TRP-related cation influx channel [Homo sapiens]			40
TUBA1C	gi 14389309	tubulin alpha 6 [Homo sapiens]	1044		
TUBB	gi 135490	Tubulin beta chain (Beta-tubulin)	1310		
Tubb6	gi 27754056	Tubulin, beta 6 [Mus musculus]			134
TWF1	gi 18490199	Unnamed protein product [Homo sapiens] (vgl PTK9)		50	
TXNDC12	gi 14286234	Thioredoxin domain containing 12 (endoplasmic reticulum) [Homo sapiens]	47		
UACA	gi 219521483	Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats [Homo sapiens]			42
UNC13C	gi 122937514	Unc-13 homolog C [Homo sapiens]		45	
unknown	gi 190613450	Chain A, Critical Structural Role For The Ph And C1 Domains Of The Vav1 Exchange Factor			40
unknown	gi 196049860	Chain A, Crystal Structure Of Fabox108			250
unknown	gi 33356966	Chain A, Crystal Structure Of Human Angiogenin In Complex With Fab Fragment Of Its Monoclonal Antibody Mab 26-2f			230
unknown	gi 215261502	Chain A, Crystal Structure Of The Human Brain Alpha Spectrin Repeats 15 And 16. Northeast Structural Genomics Consortium Target Hr5563a.			171
unknown	gi 2982013	Chain A, Cyanomet Rhb1.1 (Recombinant Hemoglobin)		163	
unknown	gi 157881403	Chain A, The Structure Of Crystalline Profilin-Beta-Actin			521

unknown	gi 224036249	Chain B, Crystal Structure Of The Eif4a-Pdcd4 Complex			48
unknown	gi 159164545	Chain B, Nmr Solution Structure Of The Human Spliceosomal Protein Complex P14-Sf3b155			78
unknown	gi 82407447	Chain C, Crystal Structure Of Human Calprotectin(S100a8S100A9)			104
unknown	gi 46015966	Chain L, Human Thrombopoietin Functional Domain Complexed To Neutralizing Antibody Tn1 Fab			250
unknown	gi 88192893	Chain P, 2.5 Angstrom Resolution Structure Of The Spliceosomal Protein P14 Bound To Region Of Sf3b155			71
unknown	gi 13096378	Chain R, Crystal Structure Of The Salmonella Tyrosine Phosphatase And Gtpase Activating Protein Sptp Bound To Rac1			40
unknown	gi 119576010	HCG1992406, isoform CRA_a [Homo sapiens]			93
unknown	gi 119584402	HCG1995701, isoform CRA_a [Homo sapiens]			64
unknown	gi 119612464	HCG20597, isoform CRA_a [Homo sapiens]			43
unknown	gi 119583342	HCG24487, isoform CRA_a [Homo sapiens]		195	
unknown	gi 119580265	HCG41639, isoform CRA_a [Homo sapiens]		51	
unknown	gi 6003534	Hemoglobin beta		77	
unknown	gi 7439107	Ig kappa chain V region (A7) - human			53
unknown	gi 74747670	Putative small nuclear ribonucleoprotein polypeptide E-like protein 1		48	

unknown	gi 110474	Ig kappa chain V region - mouse	213		
unknown	gi 57526674	fetuin [Ovis aries]	156		
UPF1	gi 1575536	regulator of nonsense transcript stability [Homo sapiens]	54		
USP39	gi 37231483	USP39 protein [Homo sapiens]	153		
WDR68	gi 28879003	WD repeat domain 68 [Mus musculus]	199		
WDR77	gi 19263322	WD repeat domain 77 [Mus musculus]	188		
XRCC5	gi 10863945	ATP-dependent DNA helicase II [Homo sapiens]	74		
YME1L1	gi 119606477	YME1-like 1 (S. cerevisiae), isoform CRA_c [Homo sapiens]		46	
YPEL5	gi 7706341	yippee-like 5 [Homo sapiens]	62		
YWHAZ	gi 112696	14-3-3 protein zeta/delta (Protein kinase C inhibitor protein 1) (KCIP-1)	146		
ZC3H13	gi 116008442	zinc finger CCCH-type containing 13 [Homo sapiens]		44	
ZFP28	gi 20379689	ZFP28 protein [Homo sapiens]			40
ZNF146	gi 153791570	zinc finger protein 146 [Homo sapiens]	42		
ZNF566	gi 194387930	ZNF566		36	
ZNF593	gi 154759288	zinc finger protein 593 [Mus musculus]	67		
ZNF609	gi 119598094	Zinc finger protein 609, isoform CRA_c [Homo sapiens]			45
ZNF646	gi 23273440	Zinc finger protein 646 [Homo sapiens]		52	
ZNHIT2	gi 7656936	Zinc finger, HIT domain containing 2 [Homo sapiens]		47	
ZRSR2	gi 6005926	U2 (RNU2) small nuclear RNA auxiliary factor 2 isoform a [Homo sapiens]	292		

Tabelle 3.4 b: Mittels Co-Immunpräzipitation und anschließender massenspektrometrischer Analyse identifizierte potentielle Interaktionspartner von Sp2. Aufgelistet sind alle Proteine, die in zwei oder drei Proben identifiziert wurden (Zellextrakt: ZE, Kernextrakt: KE).

Genname	Accession Nr.	Proteinname	Mascot Score (ZE) 1. Experiment	Mascot Score (ZE) 2. Experiment	Mascot Score (KE) 2. Experiment
AIFM1	gi 22202629	Programmed cell death 8 isoform 2 [Homo sapiens]		44	44
ATP5A1	gi 4757810	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit precursor [Homo sapiens]		75	66
BAT2	gi 116283913	HLA-B associated transcript 2 [Homo sapiens]	138	45	
CAD	gi 18105007	Carbamoylphosphate synthetase 2/aspartate transcarbamylase/dihydroorotase [Homo sapiens]	86	40	85
CDC2	gi 4502709	CDC2 protein [Homo sapiens]	156	38	
DPM1	gi 2258418	Dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1, catalytic subunit, isoform CRA_b [Homo sapiens]	61	42	
E2F6	gi 109637795	E2F transcription factor 6 [Homo sapiens]	149	69	
EEF1G	gi 39644794	Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma [Homo sapiens]		96	68
EMD	gi 4557553	Emerin [Homo sapiens]		66	60
GSTP1	gi 2204207	Glutathione S-transferase [Homo sapiens]	69	103	
HMMR	gi 194381100	Hyaluronan mediated motility receptor [Homo sapiens]		37	34
HNRNPA1	gi 73954274	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, isoform CRA_f [Homo sapiens]	66	49	
HNRNPH2	gi 9624998	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 [Homo sapiens]		256	87
Hnrnpk	gi 460789	Unnamed protein product [Mus musculus]		208	246
NCOR2	gi 116256453	Nuclear receptor co-repressor 2 isoform 1 [Homo sapiens]		35	38

NDUFS1	gi 119590785	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa (NADH-coenzyme Q reductase), isoform CRA_a [Homo sapiens]		52	37
PCGF6	gi 58761530	Polycomb group ring finger 6, isoform CRA_a [Homo sapiens]	88	41	
PCNA	gi 49168490	Proliferating cell nuclear antigen [Homo sapiens]	51	43	
PPP2R2A	gi 5902681	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), alpha isoform, isoform CRA_d [Homo sapiens]	132	172	
PPP2R5C	gi 119602163	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), gamma isoform, isoform CRA_f [Homo sapiens]		45	55
RBBP4	gi 5032027	Retinoblastoma binding protein 4 isoform a [Homo sapiens]	245	81	
RCN1	gi 41350407	Reticulocalbin-1 precursor [Homo sapiens]	65	48	47
SMC4	gi 50658063	SMC4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1 [Homo sapiens]	98	38	
SP2	gi 125625318	Sp2 transcription factor [Homo sapiens]	616	263	96
SPRR2A	gi 5174693	Small proline-rich protein 2A [Homo sapiens]		38	44
SPSB3	gi 45710089	SplA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 3 [Homo sapiens]		35	34
STOM		Band 7.2b stomatin		468	73
TRIM28	gi 31544959	TRIM28 protein [Homo sapiens]	43		51
TRIP13	gi 11321607	Thyroid hormone receptor interactor 13 [Homo sapiens]		69	34
unknown	gi 159163578	Chain A, Solution Structure Of Rrm Domain In Splicing Factor 3b		164	93
unknown	gi 118406120	Immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]		34	47

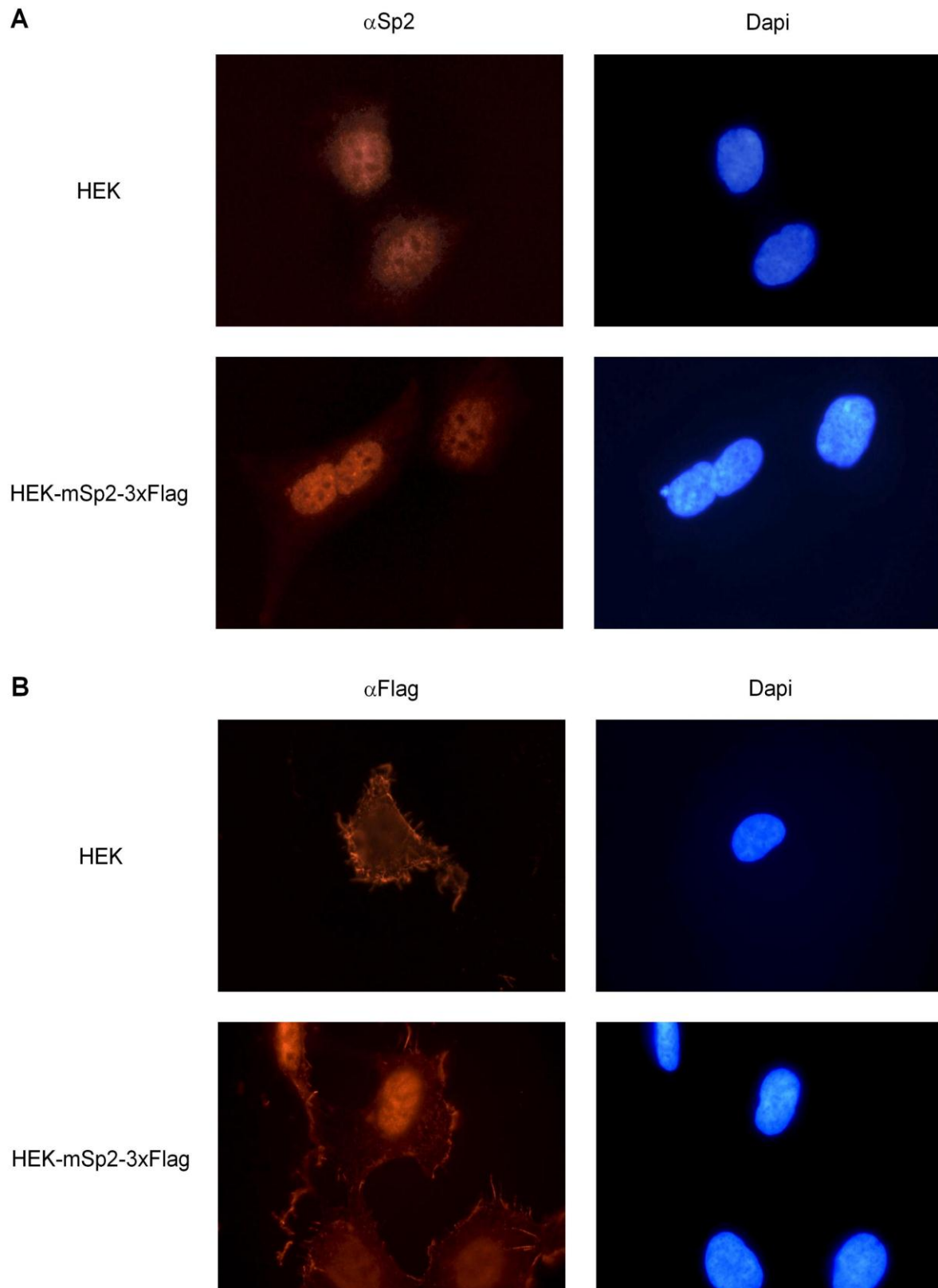


### **3.5 Subzelluläre Lokalisation von Sp2 Protein**

Um die Lokalisation von Sp2 Protein in murinen und humanen Zellen zu untersuchen und die Spezifität der verschiedenen Antikörper zu vergleichen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt.

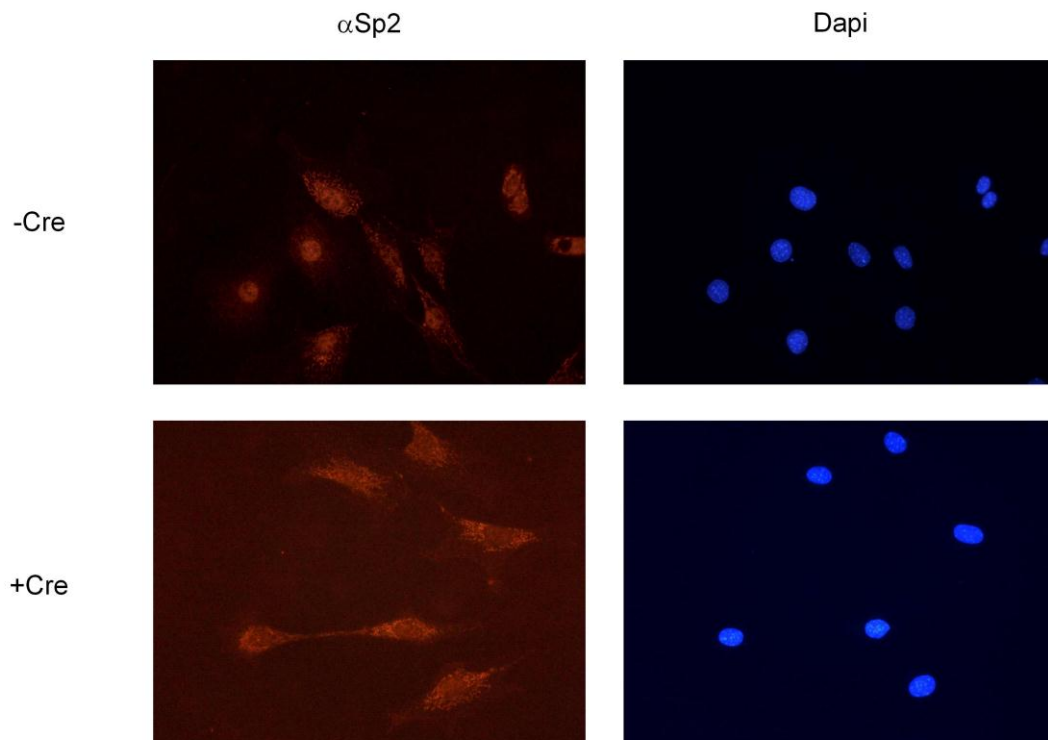
Zunächst wurden, unter Verwendung eines affinitätsgereinigten Kaninchen anti-Sp2 Antikörpers, endogenes Sp2 Protein sowie exogenes murines Sp2 Protein mit 3xFlag-Tag (mSp2-3xFlag) in HEK293 Zellen nachgewiesen. Beide Proteine befanden sich im Zellkern, eine zytoplasmatische Färbung war nicht zu beobachten (Abb. 3.5.1 A). Auch bei Verwendung eines Maus  $\alpha$ Flag Antikörpers, der mSp2-3xFlag erkennt, konnte eine spezifische Kernfärbung beobachtet werden, wobei dieser Antikörper auch Strukturen an der Zellmembran erkannte (Abb. 3.5.1 B).

In murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) konnte ebenfalls eine Kernfärbung nachgewiesen werden, wobei bei Verwendung des affinitätsgereinigten Kaninchen  $\alpha$ Sp2 Antikörpers in murinen Zellen zusätzlich eine zytoplasmatische Färbung auftritt (Abb. 3.5.2). Der kommerziell erhältliche  $\alpha$ Sp2-Antikörper (Santa Cruz) konnte für die Detektion von Sp2 Protein in MEFs nicht verwendet werden, da er kein murines Sp2 erkennt (vgl. Abb. 2.2.9). Um zu testen, ob sich in MEFs Sp2 Protein im Zytoplasma befindet oder ob diese Färbung unspezifisch ist, wurden daher Sp2cko/cko MEFs verwendet. Durch Infektion mit einem Retrovirus, der für Cre-Rekombinase kodiert, kann das Sp2 Gen in diesen MEFs ausgeschaltet werden (Sadic 2009). Der Vergleich von Sp2wt/wt MEFs mit Sp2ko/ko MEFs zeigte, dass die zytoplasmatische Färbung mit dem affinitätsgereinigten  $\alpha$ Sp2 Antikörper nicht auf Sp2 zurück zu führen ist, sondern dass es sich vermutlich um ein Protein handelt, mit dem der Antikörper kreuzreagiert. Eine Kreuzreaktivität wurde bei Verwendung von Gesamtzellextrakten auch im Western Blot beobachtet (vgl. Abb. 3.6.1 C).



**Abbildung 3.5.1: Subzelluläre Lokalisation von Sp2 Protein in HEK293 Zellen. A. Nachweis von endogenem Sp2 und mSp2-3xFlag.** Mittels Immunfluoreszenz wurde Sp2 in untransfizierten HEK293 Zellen sowie in stabil transfizierten HEK-mSp2-3xFlag Zellen nachgewiesen. Verwendet wurde ein affinitätsgereinigter Kaninchen  $\alpha$ Sp2 Antikörper (1:50) und ein Alexa Fluor 594-konjugierter sekundärer Antikörper (1:200). Zum Anfärben der DNA wurde DAPI verwendet (Vergrößerung 200x).

**B. Nachweis von mSp2-3xFlag.** Mittels Immunfluoreszenz wurde mSp2-3xFlag in stabil transfizierten HEK-mSp2-3xFlag Zellen nachgewiesen. Als Kontrolle dienten untransfizierte HEK293 Zellen. Verwendet wurde ein Maus  $\alpha$ Flag Antikörper (1:240) und ein Cy3-konjugierter sekundärer Antikörper (1:200). Zum Anfärben der DNA wurde DAPI verwendet (Vergrößerung 200x).

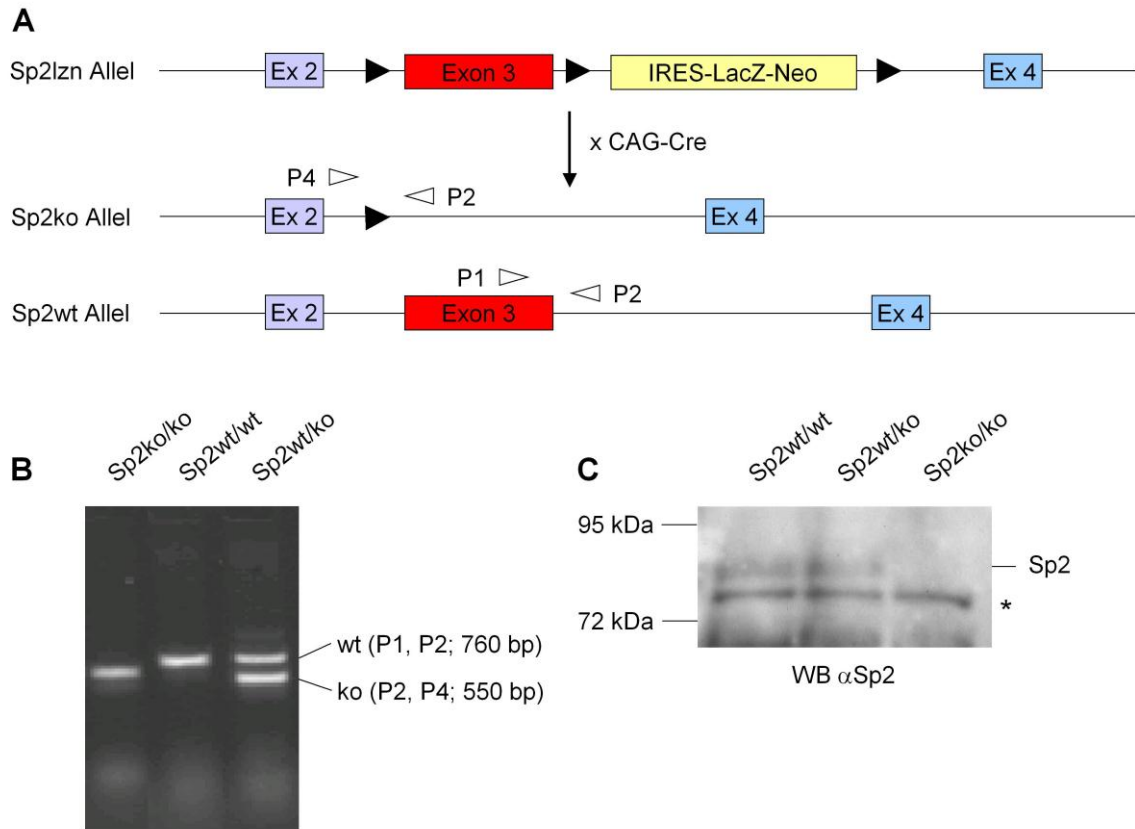


**Abbildung 3.5.2: Subzelluläre Lokalisation von Sp2 Protein in murinen embryonalen Fibroblasten.** Mittels Immunfluoreszenz wurde Sp2 Protein in MEFs nachgewiesen. Als Kontrolle dienten MEFs, in denen Exon 3 des Sp2 Gens durch Retrovirus-vermittelte Cre-Rekombinase Expression deletiert worden war (+Cre). Verwendet wurde ein affinitätsgereinigter Kaninchen  $\alpha$ Sp2 Antikörper (1:50) und ein Alexa Fluor 594-konjugierter sekundärer Antikörper (1:200). Zum Anfärben der DNA wurde DAPI verwendet (Vergrößerung 200x).

### **3.6 Untersuchungen zur Funktion von Sp2 im Mausmodell**

Zusätzlich zu den biochemischen Untersuchungen sollte die biologische Funktion von Sp2 im Mausmodell untersucht werden. Zu Beginn dieser Arbeit bereits vorhanden waren die Sp2<sup>lzn</sup> und Sp2<sup>ko</sup> Mauslinien (Baur 2005, Baur et al., 2010). Zur Herstellung transgener Mäuse war eine „triple-LoxP“ Strategie gewählt worden, die sowohl die Generierung einer *knock-out* Linie als auch einer konditionellen *knock-out* Linie ermöglichen sollte. Dazu wurde ein Targetingvektor verwendet, in dem Exon 3 des Sp2 Gens von zwei LoxP-Sequenzen flankiert wird, gefolgt von einer IRES-LacZ-Neomycin Selektionskassette und der dritten LoxP-Sequenz (Abb. 3.6.1). Mäuse, die heterozygot für das transgene IRES-LacZ-Neomycin (Sp2<sup>lzn</sup>) Allel sind, besitzen keinen offensichtlichen Phänotyp und wurden miteinander gekreuzt, um homozygote Sp2<sup>lzn/lzn</sup> Mäuse zu erhalten. Diese sterben noch vor der Geburt und sind bereits an Tag 18,5 der Embryonalentwicklung kleiner und leichter als ihre Sp2<sup>wt/wt</sup> und Sp2<sup>wt/lzn</sup> Wurfgeschwister. Dabei sind sie zum Teil in ihrer gesamten Entwicklung verzögert (Baur 2005).

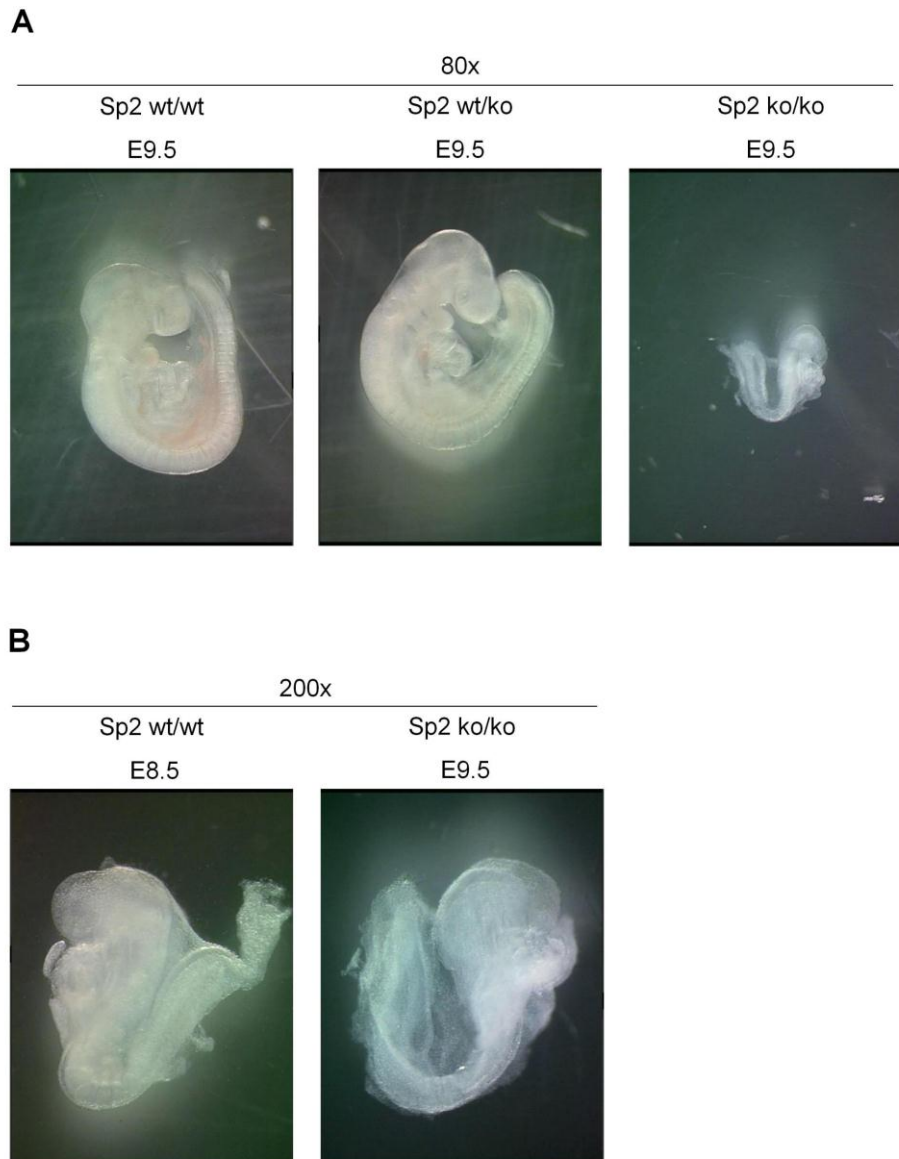
CAG-Cre Mäusen, die Cre-Rekombinase konstitutiv exprimieren (Sakai und Miyazaki, 1997), wurden mit Sp2<sup>wt/lzn</sup> Mäusen gekreuzt, so dass eine Mauslinie entstand, die heterozygot für das Sp2 *knock-out* (ko) Allel ist (Abb. 3.6.1). Diese heterozygoten Mäuse weisen keinen offensichtlichen Phänotyp auf und wurden miteinander gekreuzt, um Sp2<sup>ko/ko</sup> Mäuse zu erhalten. Mäuse, die homozygot für das knock-out Allel sind, sind nicht lebensfähig und sterben während der frühen Embryonalentwicklung. So wurden keine lebenden Sp2<sup>ko/ko</sup> Embryonen zu einem späteren Stadium als E9,5 nachgewiesen (Baur et al., 2010). Zudem sind Sp2<sup>ko/ko</sup> Embryonen an E9,5 deutlich kleiner und weniger weit entwickelt als ihre Sp2<sup>wt/ko</sup> oder Sp2<sup>wt/wt</sup> Wurfgeschwister (Baur et al., 2010 und Abb. 3.6.2 A), sodass sie in Größe und Entwicklungsstadium eher E8,5 Embryonen entsprechen (Baur et al., 2010 und Abb. 3.6.2 B). Bereits an E7,5 sind Sp2<sup>ko/ko</sup> Embryonen weniger weit entwickelt als ihre Wurfgeschwister (Baur et al., 2010, Allweiss 2009), was darauf schließen lässt, dass eine generelle Entwicklungsverzögerung besteht und nicht einzelne Gewebe oder Organe betroffen sind, deren funktionelle Beeinträchtigung zum Absterben der Embryonen führen würde.



**Abbildung 3.6.1: Herstellung einer Sp2 knock-out Maus. A. Schematische Darstellung der verschiedenen transgenen Sp2-Allele mit Genotypisierungsstrategie.** Mäuse mit dem Sp2ko-Allel wurden durch Kreuzung von Sp2wt/lzn Mäusen mit CAG-Cre Mäusen hergestellt. Dabei wurden durch die Aktivität der Cre-Rekombinase sowohl Exon 3 als auch die Selektionskassette (IRES-LacZ-Neo) entfernt. Homozygote Sp2ko/ko Mäuse entstanden durch Kreuzung von heterozygoten Sp2wt/ko Mäusen. Schwarze Pfeile stellen die LoxP-Sites dar, weiße Pfeile zeigen die Lage der Primer zur Genotypisierung (hellblau: Exon 2, dunkelblau: Exon 4, rot: Exon 3, gelb: Selektionskassette). **B. Genotypisierung von Sp2ko/ko Mäusen.** Gezeigt wird ein Beispiel der Genotypisierung zur Analyse der Sp2wt- und Sp2ko Allele. Genomische DNA wurde aus Mausschwänzen extrahiert und für eine PCR mit den in A dargestellten Primern verwendet. Es entsteht ein 760 bp PCR-Produkt am wt-Allel (P1, P2) und ein 550 bp PCR-Produkt am ko-Allel (P2, P4). **C. Western Blot.** Aus MEFs der angegebenen Genotypen wurden Gesamtzellextrakte hergestellt, jeweils 20 µg durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion von Sp2 erfolgte mit einem affinitätsgereinigten αSp2 Antikörper. Sp2 ist als etwa 80 kDa große Bande nachweisbar, die in Sp2ko/ko MEFs fehlt (\* kreuzreaktive Bande).

### 3.6.1 Phänotyp von Sp2ko/ko MEFs

Mäuse, die homozygot für das Sp2ko/ko Allel sind, sind nicht lebensfähig und sterben während der Embryonalentwicklung, so dass lebende Sp2ko/ko Embryonen nicht später als an Tag 9,5 der Embryonalentwicklung gefunden werden konnten. Um dennoch die biologische Funktion von Sp2 untersuchen zu können, sollten murine embryonale Fibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) hergestellt und kultiviert werden. Die oben beschriebene Entwicklungsverzögerung von Sp2ko/ko

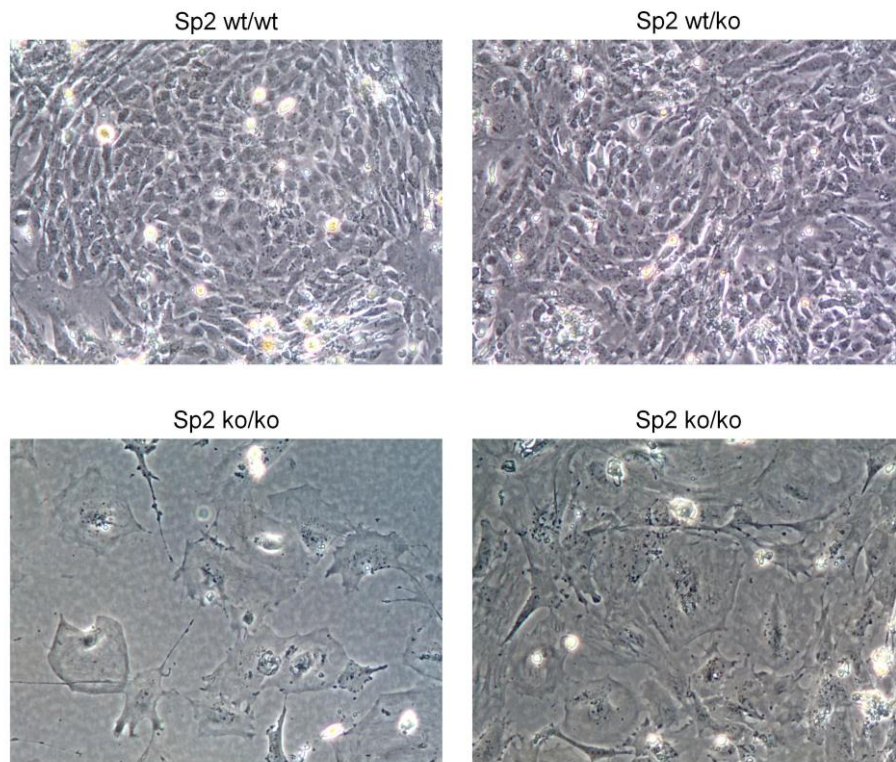


**Abbildung 3.6.2: Phänotyp von Sp2ko/ko Embryonen. A. Wurfgeschwister an E9,5.** An E9,5 weisen Sp2ko/ko Embryonen eine deutliche geringere Größe auf als ihre Wurfgeschwister und sind entwicklungsverzögert (Modifiziert nach Baur et al., 2010). **B. Vergleich von Sp2wt/wt an E8,5 mit Sp2ko/ko an E9,5.** Während sich Sp2wt/wt und Sp2wt/ko Embryonen normal entwickeln (A), weisen Sp2ko/ko Embryonen eine deutliche Entwicklungsverzögerung auf, so dass ihr Entwicklungsstand an E9,5 dem eines normal entwickelten Embryos an E8,5 entspricht (Modifiziert nach Baur et al., 2010).

Embryonen im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern (Abb. 3.6.2 A) wurde während der Präparationen zur Herstellung von MEFs bestätigt. Sp2ko/ko Embryonen an E9,5 sahen stets aus wie Wildtyp-Embryonen an E8,5. Obwohl die verwendeten Sp2ko/ko Embryonen vital waren und einen Herzschlag aufwiesen, war es nicht möglich, MEFs aus Sp2ko/ko Embryonen zu kultivieren. Im Gegensatz zu Sp2wt/wt und Sp2wt/ko MEFs aus Wurfgeschwistern proliferierten Sp2ko/ko MEFs in Kultur nicht.



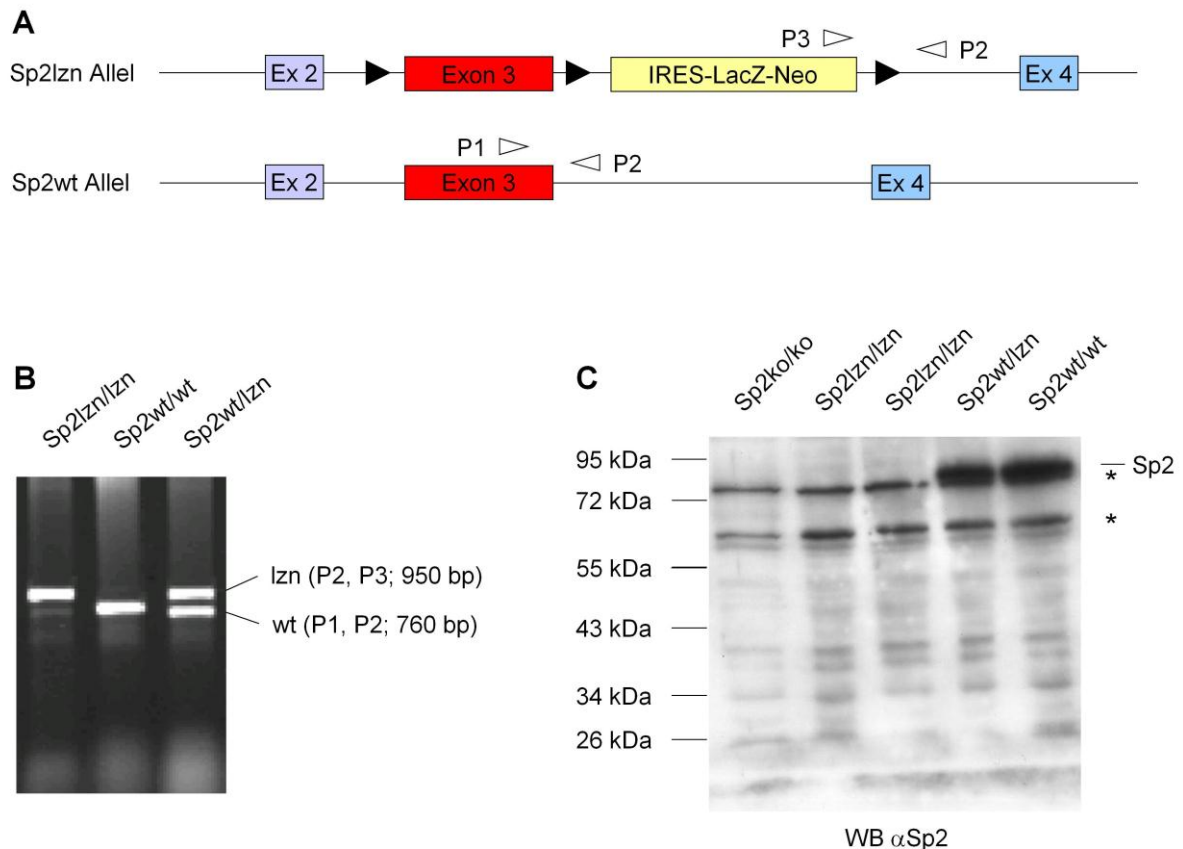
Stattdessen nahmen sie eine flache, ausgebreitete Form an, die an seneszente Zellen erinnert (Abb. 3.6.1.1). Mittels Western Blot konnte trotz der stark eingeschränkten Verfügbarkeit von Material gezeigt werden, dass in diesen MEFs kein Sp2 Protein nachweisbar ist (Abb. 3.6.1 C).



**Abbildung 3.6.1.1: Phänotyp von Sp2ko/ko MEFs.** Aus Embryonen mit den angegebenen Genotypen wurden an E9,5 MEFs isoliert und in Kultur genommen. Fünf Tage nach der Präparation wurden repräsentative Bilder von MEFs mit den oben angegebenen Genotypen aufgenommen. Im Gegensatz zu MEFs aus ihren Sp2wt/wt und Sp2wt/ko Wurfgeschwistern proliferieren Sp2ko/ko MEFs nicht, sondern nehmen eine flache, ausgebreitete Form an. Dieser Befund verändert sich zu späteren Zeitpunkten nicht (Vergrößerung 100x).

### 3.6.2 Phänotyp von Sp2<sup>lzn/lzn</sup> MEFs

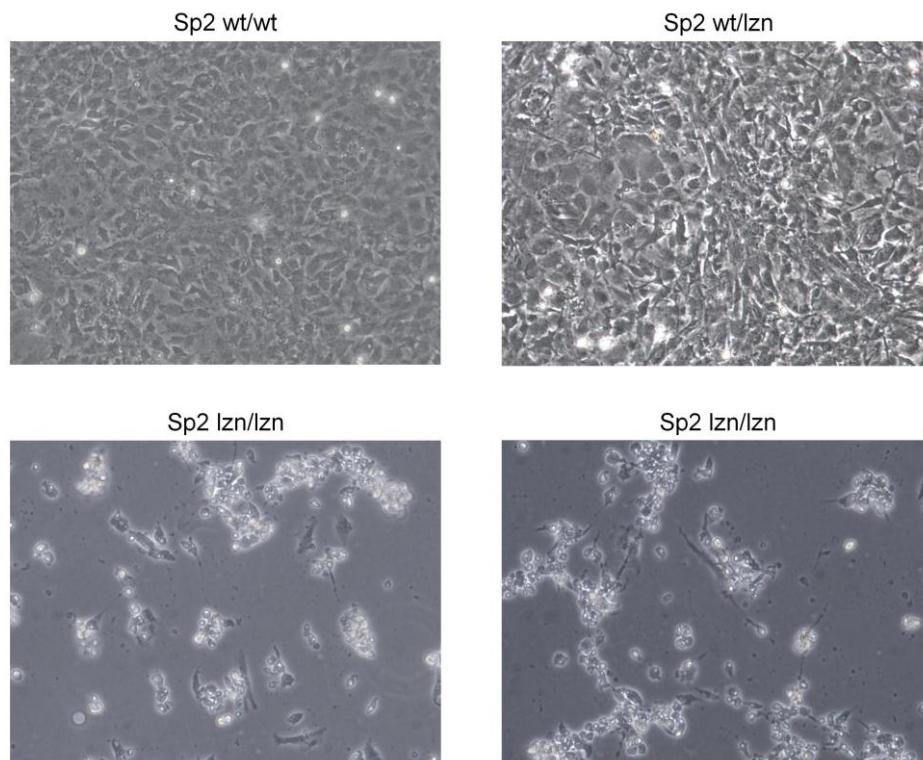
Die Kultivierung von MEFs aus Sp2ko/ko Embryonen erwies sich als nicht möglich. Zudem waren Sp2ko/ko Embryonen an E9,5 immer kleiner als ihre Sp2wt/wt und Sp2wt/ko Wurfgeschwister und entsprachen eher Wildtyp-Embryonen an E8,5. Um zu untersuchen, ob der Phänotyp der Sp2ko/ko MEFs durch den Verlust von Sp2 Protein oder durch die generell verzögerte Entwicklung dieser Embryonen hervorgerufen wurde, wurden aus 13,5 Tage alten Sp2<sup>lzn/lzn</sup> Embryonen MEFs hergestellt. Wie in Sp2ko/ko MEFs auch, ist in diesen Zellen kein Sp2 Protein nachweisbar (Abb. 3.6.2.1). Auch MEFs aus Sp2<sup>lzn/lzn</sup> Embryonen, die zum



**Abbildung 3.6.2.1: Sp2lzn/lzn MEFs. A. Schematische Darstellung der Sp2wt und Sp2lzn Allele mit Genotypisierungsstrategie.** Schwarze Pfeile stellen die LoxP-Sequenzen dar, weiße Pfeile zeigen die Lage der Primer zur Genotypisierung (hellblau: Exon 2, dunkelblau: Exon 4, rot: Exon 3, gelb: Selektionskassette). **B. Genotypisierung.** Dargestellt ist ein Beispiel einer Genotypisierung zur Analyse der Sp2wt- und Sp2lzn Allele. Genomische DNA wurde aus Mausschwänzen isoliert und für eine PCR mit den in A dargestellten Primern verwendet. Es entsteht ein 950 bp PCR-Produkt am lzn-Allel (P2, P3) und ein 760 bp PCR-Produkt am wt-Allel (P1, P2). **C. Western Blot.** Aus MEFs mit den angegebenen Genotypen wurden Gesamtzellextrakte hergestellt, jeweils 20 µg durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion von Sp2 erfolgte mit einem affinitätsgereinigten αSp2 Antikörper. Sp2 ist als etwa 80 kDa große Bande nachweisbar, die in Sp2lzn/lzn MEFs fehlt (\* kreuzreaktive Banden).

Präparationszeitpunkt (E13.5) ähnlich groß und entwickelt waren wie ihre Wurfgeschwister und einen beobachtbaren Herzschlag aufwiesen, unterschieden sich in Kultur deutlich von heterozygoten oder wildtypischen MEFs. Zwar wuchsen Sp2lzn/lzn MEFs zunächst an und proliferierten auch, starben aber nach der ersten Passage aus unbekannten Gründen ab (Abb. 3.6.2.2). Dieser Befund deutet darauf hin, dass der Verlust von Sp2 Protein einen ungewöhnlich starken, zellautonomen Phänotyp hervor ruft, der selbst das Überleben von Zellen in Kultur unmöglich macht.





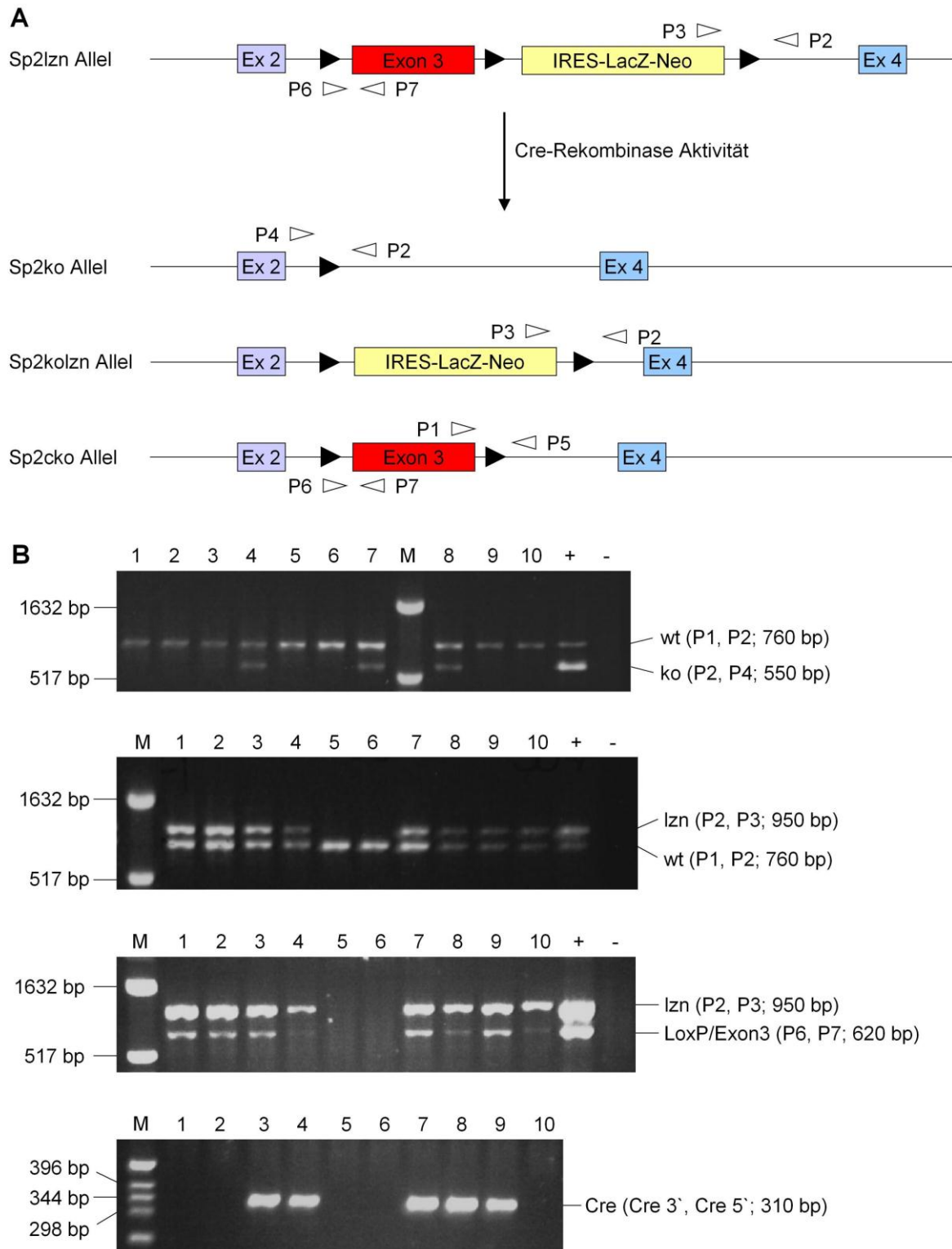
**Abbildung 3.6.2.2: Phänotyp von Sp2lzn/lzn MEFs.** Aus Embryonen mit den angegebenen Genotypen wurden an E13,5 MEFs isoliert und in Kultur genommen. Wie MEFs aus ihren Sp2wt/wt und Sp2wt/lzn Wurfgeschwistern proliferieren Sp2lzn/lzn MEFs zunächst, sterben aber nach der 1. Passage ab (Vergrößerung 100x).

### 3.6.3 Herstellung einer konditionellen Sp2 knock-out Maus

Da Sp2ko/ko Mäuse aufgrund ihres letalen Phänotyps nicht für weitergehende Analysen zur Funktion von Sp2 *in vivo* genutzt werden können, wurde zusätzlich eine konditionelle Sp2 knock-out (Sp2cko) Mauslinie hergestellt. Im Labor von S. Philipsen am Erasmus Medical Center in Rotterdam war versucht worden, diesen Genotyp mittels Injektion von Cre-RNA in befruchtete Eizellen oder durch Einkreuzen von CAG-Cre Mäusen zu erhalten. Es entstanden jeweils die Allele Sp2lzn, Sp2ko und Sp2kolzn, aber nie das Sp2cko Allel (vgl. Abb. 3.6.3.1 A). Um dennoch das Sp2cko Allel zu erhalten, wurde eine neue Strategie gewählt (Abb. 3.6.3.2). Dabei wurden Sp2wt/lzn Mäuse mit der MeuCre40 Linie gekreuzt. Die MeuCre40 Mauslinie (Leneuve et al., 2003) exprimiert Cre-Rekombinase während der Embryonalentwicklung im Morula- und Blastozystenstadium auf niedrigem Niveau. Durch Kreuzung dieser Linie mit einer transgenen Linie, die wie die Sp2 transgene

Linie auf einer triple-LoxP Strategie basiert (vgl. Abb. 3.6.1), entstehen Nachkommen, die in verschiedenen Körperzellen verschiedene Allele des Ziellokus besitzen, sogenannte Mosaik-Mäuse. Für die Kreuzung von Sp2wt/lzn Mäusen mit MeuCre40 Mäusen bedeutet das, dass man Nachkommen erwartet, die zusätzlich zum Wildtyp-Allel alle vier möglichen transgenen Sp2 Allele (Sp2lzn, Sp2ko, Sp2kolzn und Sp2cko; Abb. 3.6.3.1 A) in verschiedenen Geweben aufweisen. Um auf das Vorhandensein der verschiedenen Allele zu testen, ist es ausreichend, die Schwanzspitzen der zu untersuchenden Mäuse für die Genotypisierung zu verwenden. Ziel der Genotypisierung war es, die Tiere zu identifizieren, die das durch Rekombination entstandene Sp2cko Allel besitzen können, d.h. sie müssen positiv für das gefloxtete Exon 3 sowie für Cre-Rekombinase sein. Der Nachweis des Sp2ko-Allels bedeutet, dass Cre-vermittelte Rekombination stattgefunden hat, da keines der Elterntiere dieses Allel besaß.

Ein Beispiel einer Genotypisierung von Mosaik-Mäusen ist in Abbildung 3.6.3.1 B dargestellt. Ein Wurf mit 10 Nachkommen wurde unter Verwendung von vier verschiedenen Primerkombinationen auf das Vorhandensein aller möglichen Sp2-Allele getestet. Da die MeuCre40 Linie am Sp2 Locus ausschließlich das Wildtyp-Allel besitzt, waren alle Nachkommen heterozygot für transgene Sp2 Allele, zwei Tiere wiesen ausschließlich das Wildtyp-Allel auf (5, 6). Cre-Rekombinase wurde in fünf Tieren nachgewiesen (3, 4, 7, 8, 9). Das Vorhandensein des Sp2ko Allels war nur bei den Tieren zu erwarten, die positiv für Cre-Rekombinase waren. Nachgewiesen wurde das Sp2ko Allel bei drei Tieren (4, 7, 8). Das Sp2lzn-Allel war bei acht Tieren nachweisbar (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10). Keines dieser acht Tieren war negativ für das gefloxtete Exon 3 (LoxP/Exon3). Die Tiere 4, 7 und 8 wurden für die weitere Zucht ausgewählt, da sie die Cre-Rekombinase trugen und diese auch aktiv gewesen war, wie das Vorhandensein des Sp2ko Allels zeigt. Außerdem waren sie positiv für das gesuchte gefloxtete Exon 3 und somit potentiell für das Sp2cko Allel. Eine Unterscheidung zwischen Sp2cko, Sp2lzn und Sp2kolzn war in diesem Stadium nicht möglich, da die verschiedenen Allele zwar im gleichen Tier, aber dennoch in unterschiedlichen Geweben vorhanden sein konnten. Die Mosaik-Mäuse (insgesamt sieben aus vier Sp2wt/lzn x MeuCre40 Würfen), die die gesuchten Merkmale aufwiesen, wurden nun in der Hoffnung auf Keimbahntransmission mit C57Bl/6 Wildtyp-Mäusen verpaart. Alle 123 Nachkommen aus diesen Kreuzungen wurden dann mit der oben beschriebenen Strategie auf das Vorhandensein des



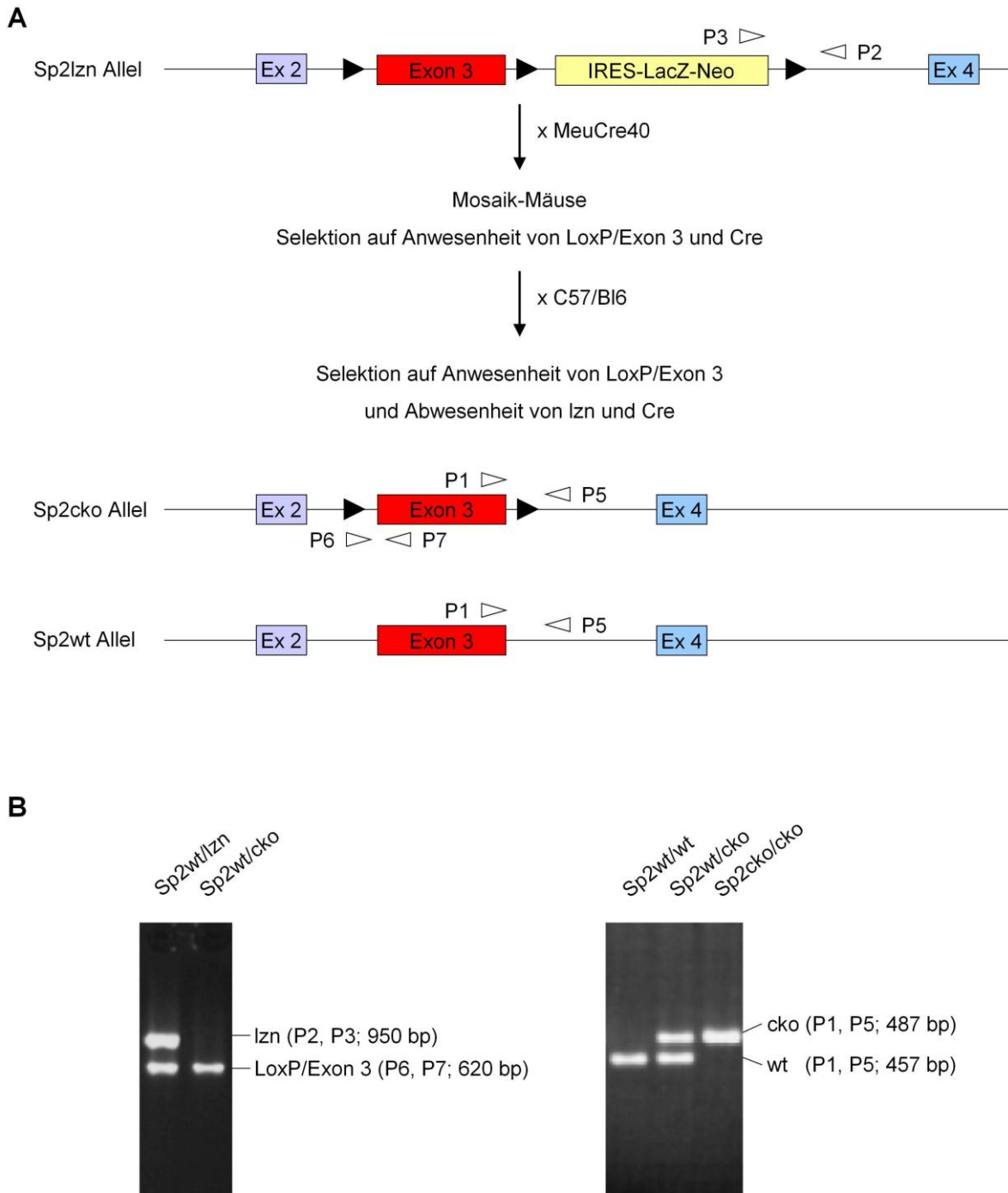
**Abbildung 3.6.3.1: Genotypisierung der Mosaik-Mäuse. A. Schematische Darstellung der möglichen Allele am Sp2-Lokus nach Cre-Rekombinase Aktivität.** Dargestellt ist der transgene Sp2-Lokus mit Exon 2 (hellblau), Exon 3 (rot), der IRES-LacZ-Neo Selektionskassette (gelb) und Exon 4 (blau), sowie den LoxP-Sequenzen (schwarze Pfeile). Durch die Aktivität der Cre-Rekombinase nach Kreuzung von Sp2wt/lzn Mäusen mit MeuCre40 Mäusen in den Morula- und Blastozystenstadien können in den resultierenden Mosaik-Mäusen die vier dargestellten Sp2-Allele ko, lzn, kolzn und cko entstehen. Dabei können in verschiedenen Körperzellen einer Mosaik-Maus verschiedene Allele vorhanden sein, so dass jedes einzelne Tier auf das Vorhandensein aller Allele getestet werden muss.

Die dabei verwendeten Primer sind ebenfalls eingezeichnet (weiße Pfeile). **B. Beispiel einer Genotypisierung von Mosaik-Mäusen.** Durch die Kreuzung von Sp2wt/lzn Mäusen mit MeuCre40-Mäusen wurden Nachkommen erhalten, die in verschiedenen Körperzellen verschiedene Sp2-Allele besitzen konnten. Daher musste jedes einzelne Tier auf das Vorhandensein aller Sp2-Allele sowie Cre-Rekombinase getestet werden. Oben dargestellt ist das Vorgehen am Beispiel eines Wurfes mit 10 Tieren. Dabei wurden pro Tier vier verschiedene Genotypisierungen mittels PCR durchgeführt. Lokalisation und Bezeichnung der Primer sind in A dargestellt (M = Größenstandard). Eine Übersicht über die Ergebnisse dieser Genotypisierung ist in Tabelle 3.6.3 zu finden.

Tabelle 3.6.3: Übersicht über die Ergebnisse der Genotypisierung von Mosaik-Mäusen (vgl. Abb. 3.6.3.1)

Tier Nummer	Sp2ko-PCR	Sp2lzn-PCR	Sp2lzn und LoxP/Exon3-PCR	Cre-PCR
1	wt/wt	wt/lzn	lzn + LoxP	-
2	wt/wt	wt/lzn	lzn + LoxP	-
3	wt/wt	wt/lzn	lzn + LoxP	Cre +
4	wt/ko	wt/lzn	lzn + LoxP	Cre +
5	wt/wt	wt/wt	-	-
6	wt/wt	wt/wt	-	-
7	wt/ko	wt/lzn	lzn + LoxP	Cre +
8	wt/ko	wt/lzn	lzn + LoxP	Cre +
9	wt/wt	wt/lzn	lzn + LoxP	Cre +
10	wt/wt	wt/lzn	lzn + LoxP	-

Sp2cko-Allels bei gleichzeitiger Abwesenheit der übrigen Allele (Sp2ko, Sp2lzn und Sp2kolzn) und Abwesenheit von Cre-Rekombinase getestet. Unter diesen 123 getesteten Mäusen wurde ein einziges Tier identifiziert, das neben dem Wildtyp-Allel auch das gesuchte Sp2cko Allel besaß, aber kein weiteres transgenes Sp2 Allel oder Cre Rekombinase aufwies. Dieses Weibchen wurde mit einem C57Bl/6-Männchen verpaart, um die Sp2cko-Linie zu gründen (vgl. Abb. 3.6.3.2 B). Diese Mauslinie steht nun zur Verfügung, um durch Einkreuzen von Mäusen, die Cre-Rekombinase in spezifischen Zelltypen oder zu spezifischen Zeitpunkten in der Embryonalentwicklung exprimieren, Sp2 gezielt zu inaktivieren.



**Abbildung 3.6.3.2: Herstellung einer konditionellen Sp2 knock out Maus (Sp2cko). A. Schematische Darstellung der Strategie zur Herstellung des Sp2cko Allels.** Durch Einkreuzen von MeuCre40 Mäusen in die Sp2wt/lzn Linie entstanden Mosaik-Mäuse, die in unterschiedlichen Geweben die verschiedenen Sp2-Allele aufwiesen. Mäuse, die für das gefloxt Exon 3 und Cre-Rekombinase positiv waren, wurden mit Wildtyp-Mäusen gekreuzt. Nachkommen aus diesen Kreuzungen wurden selektioniert auf das Vorhandensein des gefloxt Exon 3 bei gleichzeitiger Abwesenheit der IRES-LacZ-Neo Selektionskassette. (schwarze Pfeile: LoxP-Sequenzen, weiße Pfeile: Primer zur Genotypisierung, hellblau: Exon2, dunkelblau: Exon 4, rot: Exon 3, gelb: Selektionskassette). **B. Genotypisierung von Sp2cko Mäusen.** Zur Unterscheidung zwischen dem Sp2lzn Allel und dem Sp2cko Allel wurden die Primer P2, P3, P6 und P7 verwendet (siehe A). Eine 950 bp Bande entsteht bei Vorhandensein der Selektionskassette im Sp2lzn Allel (P2, P3), eine

---

620 bp Bande bei Vorhandensein des geflochtenen Exon 3, wie es bei beiden Allelen der Fall ist (linke Seite). Für die Routine-Genotypisierung zur Unterscheidung zwischen Sp2wt und Sp2cko wurden die Primer P1 und P5 eingesetzt (siehe A). Dabei entsteht für das wt-Allel eine 457 bp Bande, während eine 487 bp Bande nachweisbar ist, wenn im Anschluss an Exon 3 eine LoxP-Sequenz vorhanden ist (cko) (rechte Seite).

---

## 4. Diskussion

### 4.1 DNA-Bindungseigenschaften von Sp2

Eine Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Analyse der DNA-Bindungseigenschaften von Sp2 fortzusetzen. Es war bereits bekannt, dass volle-Länge Sp2 nicht oder allenfalls sehr schwach an DNA bindet (Moorefield et al., 2004). Außerdem war bekannt, dass die DNA-Bindung graduell zunimmt, wenn der N-Terminus von Sp2 sukzessive verkürzt wird (Baur 2005). Die Zinkfingerregion allein zeigt die erwartete DNA-Bindung mit der gleichen Spezifität für GC-Box Oligonukleotide wie sie Sp1 aufweist. Selbst nach der Fusion von Teilen des Sp2 N-Terminus an die Gal4-DNA-bindende Domäne verhält sich Sp2 ungewöhnlich, die Fusionsproteine binden gar nicht oder es entsteht eine nach oben „verschmierte“ Bande (Baur 2005). Auch nach der Herstellung von chimären Proteinen aus Sp1 und Sp2 wird die DNA-Bindung inhibiert, sobald andere Bereiche von Sp2 als die Zinkfingerdomäne enthalten sind (Moorefield et al., 2004). Diese Befunde deuten darauf hin, dass es Bereiche in Sp2 gibt, die die Fähigkeit von Sp2, an DNA zu binden, regulieren bzw. inhibieren, möglicherweise durch Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen. Um diese Bereiche zunächst weiter einzugrenzen, wurde der N-Terminus von Sp2 in vier Fragmente unterteilt, die mit der Gal4-DNA bindenden Domäne fusioniert wurden. Die Durchführung von EMSAs mit diesen vier Gal4-Sp2 Fusionsproteinen ergab, dass sie alle eine DNA-Bindung aufweisen und dass es vermutlich im Bereich von AS 1-112 sowie AS 337-448 Protein-Interaktionsdomänen gibt. Die entsprechenden Gal4-Sp2 Fusionsproteine laufen nicht als klar definierte Bande, sondern weisen einen höhermolekularen „Schmier“ auf. Dieser könnte dadurch entstehen, dass andere Proteine unter den getesteten Bedingungen an Sp2 binden und so die Laufgeschwindigkeit beeinflussen. Diese Beobachtung wird zudem untermauert durch die Befunde einer Diplomarbeit in diesem Labor (Sadic 2009). Dort war beobachtet worden, dass Sp2 (1-112) und Sp2 (337-448) nach Fusion an die Zinkfingerdomäne von Sp2 keine oder eine sehr schwache DNA-Bindung aufweisen.

Da für volle-Länge Sp2 oder verschiedene Gal4-Sp2 Deletionsmutanten bisher nie eine aktivierende Funktion nachgewiesen worden war (Baur 2005, Moorefield et al., 2004), stellte sich nun die Frage, ob die Fusionsproteine aus Gal4-BD und den N-terminalen Fragmenten von Sp2 ein Gal4-abhängiges Reportergen aktivieren

würden. Zwei der Gal4-Sp2 Fusionsproteine (Gal4-Sp2 (1-112) und Gal4-Sp2 (228-339)) bewirkten eine etwa vierfache Aktivierung, während die anderen beiden Fusionsproteine (Gal4-Sp2 (113-224) und Gal4-Sp2 (337-448)) das Reportergen nicht aktivierten. Gal4-Sp1 (1-186) dagegen führte im gleichen Experiment zu einer 40fachen Aktivierung des Reportergens. Sp2 besitzt also unter den bisher getesteten Bedingungen nur eine schwache Aktivatorfunktion, die aber nicht auf fehlende DNA-Bindung der getesteten Fusionsproteine zurück zu führen ist.

Um die potentielle Protein-Protein Interaktionsdomäne zwischen AS 1 und 112 weiter einzugrenzen, wurden in Gal4-Sp2 (1-112) interne Deletionen gesetzt. Die Deletion von AS 46-63 verstärkte den „Schmier“ im EMSA deutlich, während dieser Effekt nach Deletion von AS 62-75, AS 76-88 oder AS 86-97 nicht mehr zu beobachten war. Vermutlich befindet sich also zwischen AS 62-97 ein Motiv für die Interaktion mit anderen Proteinen. Zusätzlich gestärkt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass diese gesamte Region im Sp2 Protein stark konserviert ist, wie ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von Sp2 aus Zebrafisch (*Danio rerio*), Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) und verschiedenen Säugetieren (*Monodelphis domestica*, *Homo sapiens* und *Mus musculus*) zeigt (vgl. Abb. 3.1.2 A). Eine wichtige physiologische Funktion dieser Region ist daher sehr wahrscheinlich.

Ein weiteres inhibitorische Motiv befindet sich zwischen AS 337-449 und damit direkt vor der Zinkfingerregion. Um dieses Motiv weiter einzugrenzen, wurde der Bereich vor der Zinkfingerregion sukzessive verkürzt und die daraus resultierenden Fragmente im EMSA getestet. Dabei wurde eine graduelle Zunahme der DNA-Bindung beobachtet. Offensichtlich ist also auch hier ein größerer Bereich an der Regulation der DNA-Bindung beteiligt.

Falls interagierende Proteine der Grund dafür wären, dass volle-Länge Sp2 im EMSA nicht an DNA bindet, sollte eine DNA-Bindung nachweisbar sein, nachdem diese Interaktionspartner aus dem Kernextrakt entfernt wurden. Daher wurden Sp2, Sp3 und Sp4 mit N-terminalem HA-Flag Epitop in SL2 Zellen exprimiert und die Kernextrakte mit einer  $\alpha$ Flag Matrix inkubiert. Anschließend wurden die gekoppelten Proteine unter stringenten Bedingungen gewaschen und mit 3xFlag Peptid von der Matrix eluiert, bevor ein EMSA durchgeführt wurde. Sp3 und Sp4 binden unter diesen Bedingungen an das GC-Box Oligonukleotid. Überraschend war jedoch der Befund, dass Sp2 auch dann im EMSA nicht an DNA bindet, wenn es zuvor



aufgereinigt wurde. Entweder ist also die Interaktion zwischen Sp2 und seinen Interaktionspartnern, die eine DNA-Bindung inhibieren, ausgesprochen stark oder die DNA-Bindung wird auf andere Weise reguliert, z.B. durch posttranslationale Modifikationen.

Da eine Phosphorylierung von Sp2 an Serin 78 und Tyrosin 549 im Rahmen eines proteomweiten Screenings beschrieben worden war (Dephoure et al., 2008), wurde zunächst getestet, ob eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase zur Entfernung der Phosphorylierung oder die Zugabe von Phosphataseinhibitor zur Verhinderung der Dephosphorylierung einen Einfluss auf die DNA-Bindung hat. Weder volle-Länge Sp2 noch Sp2 (1-112 + 449-612) und Sp2 (337-612) binden unter diesen Bedingungen an das GC-Box Oligonukleotid. Die Fähigkeit von Sp2 DNA zu binden, wird also nicht durch seinen Phosphorylierungsstatus reguliert. Weitere Posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierung, Acetylierung, oder SUMOylierung, die für Sp1 und Sp3 bekannt sind (Bouwman und Philipsen 2002, Sapetschnig et al., 2002), wurden für Sp2 bisher nicht beschrieben und wurden nicht getestet.

Ein Gebiet, auf dem in den letzten Jahren bereits große Fortschritte gemacht wurden und in dem in den kommenden Jahren mit weiteren neuen Erkenntnissen zu rechnen ist, ist die Regulation der Genexpression durch nicht-kodierende RNAs (*non-coding RNA*; ncRNA). Bisher sind dreizehn verschiedene Klassen von ncRNAs bekannt, die an der Regulation zahlreicher Prozesse beteiligt sind, wie z.B. Repression der Translation (miRNA), Abbau von mRNAs (siRNA) oder Ausbildung von Heterochromatin (rasi/piRNAs) (Zhou et al., 2010). Zudem wurde berichtet, dass es eine regulatorische RNA gibt, die am humanen Dihydrofolatreduktase (DHFR) Promotor einen Triplex mit dem DNA-Doppelstrang eingeht und so die Transkription von diesem Promotor aus reguliert (Gee et al., 1992, Martianov et al., 2007). Interessant ist der DHFR Promotor in diesem Zusammenhang vor allem deshalb, weil er Bindungsstellen für Sp-Faktoren enthält. Überraschenderweise konnte Sp2 in Chromatinimmunpräzipitationen (ChIP) ebenso wie Sp1 und Sp3 am DHFR Promotor nachgewiesen werden (persönliche Kommunikation Dr. Bastian Stielow). Auch wenn eine ChIP keinen Rückschluss darüber erlaubt, ob ein Protein direkt an DNA bindet oder über interagierende Proteine in die Nähe der DNA gelangt und daher immunpräzipitiert wird, spielt Sp2 offenbar zumindest eine Rolle in der Nähe der DNA. Eine sehr spekulative, aber interessante Möglichkeit wäre eine Interaktion von

---

Sp2 mit regulatorischen RNAs. Da für die Regulation der DNA-Bindungsfähigkeit von Sp2 offenbar längere Aminosäuresequenzen eine Rolle spielen, wäre auch eine Interaktion mit einem großen Molekül wie einer ncRNA prinzipiell denkbar. Eine solche regulatorische RNA könnte für die DNA Bindung erforderlich sein oder aber diese verhindern. Um diese Möglichkeit zu Testen, wurden HA-Flag-Sp1, -Sp2 und -Sp3 mit RNase A bzw. RNase Inhibitor behandelt. Auch diese Behandlung hatte keinerlei Einfluss auf die DNA-Bindung von Sp2. Während Sp1 und Sp3 auch unter diesen Bedingungen das GC-Box Oligonukleotid banden, konnte keine DNA-Bindung durch Sp2 nachgewiesen werden.

Da *in vivo* längere DNA-Sequenzen für die Regulation der Promotoraktivität eine Rolle spielen, während in EMSAs Oligonukleotide verwendet werden, die etwa 24 Nukleotide umfassen, ist nicht auszuschließen, dass die Beteiligung einer ncRNA unter den gewählten artifiziellen Bedingungen nicht nachgewiesen werden kann. Interessant wäre es daher, die Situation am endogenen DHFR-Promotor nach Behandlung mit RNase A oder RNase Inhibitor mittels ChIP zu untersuchen.

Ein detaillierter Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden Regionen, in denen regulatorische Motive vermutet wurden (AS 62-97 und AS 337-448), zeigte, dass es dort Prolin-haltige Motive gibt (PIKPA und PKIAP, vgl. Abb. 3.1.8 A), die für die Regulation der DNA-Bindung eine Rolle spielen könnten. Ein drittes Motiv befindet sich bei Aminosäure 177. Diese Motive sind innerhalb von Sp2 und über verschiedene Spezies stark konserviert, sind jedoch in keinem anderen Sp Faktor zu finden. Eine Funktion dieser Motive ist zur Zeit nicht bekannt. Auch im Umfeld der PIKPA/PKIAP Motive befinden sich konservierte Aminosäuren, die möglicherweise eine Rolle spielen. Daher wurden diese drei Motive sowie umgebende Aminosäuren deletiert und die Deletionsmutanten auf DNA-Bindung getestet. Die Deletion des ersten Motivs allein hatte keinen Effekt. Wurden Motiv 1 und 2 deletiert, war eine DNA-Bindung zu beobachten, die durch die Deletion des dritten Motivs weiter verstärkt wurde. Allerdings ist die beobachtete DNA-Bindung nach Deletion aller drei Motive immer noch schwächer als die der Zinkfingerregion allein. Es muss also weitere, bisher unbekannte, Sequenzen geben, die an der Regulation der DNA-Bindung beteiligt sind.

Im Rahmen einer Bachelorarbeit (Herdt 2011) wurden weitere Kombinationen von Deletionen im EMSA getestet. Dabei zeigte sich, dass die Deletion von Motiv 2 oder 3 allein bereits eine schwache DNA-Bindung ermöglichte, die nach Deletion eines

---

weiteren Motivs (1 bzw. 2) verstärkt wurde. Offensichtlich ist also jedes dieser Motive an der Regulation der DNA-Bindung durch Sp2 beteiligt. Zusätzlich wurden die PIKPA- bzw. PKIAP-Motive so mutiert, dass sie aus fünf Alaninresten bestanden, und diese Mutanten dann im EMSA auf DNA-Bindung getestet. Jedoch zeigte sich, dass die Mutation dieser vier Aminosäuren allein nicht ausreicht, um die Inhibition der DNA-Bindung aufzuheben. Durch weitere Mutationsanalysen könnte in Zukunft geklärt werden, welche Aminosäuren es im Einzelnen sind, die die DNA-Bindung von Sp2 inhibieren.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass volle-Länge Sp2 unter den getesteten Bedingungen im EMSA nicht an DNA bindet und dass es offenbar größere Bereiche im Sp2 Protein gibt, die auf bisher unbekannte Weise eine DNA-Bindung verhindern. In scheinbarem Widerspruch dazu konnte Sp2 mittels ChIP am DHFR-Promotor nachgewiesen werden (persönliche Kommunikation Dr. Bastian Stielow). Da der Nachweis eines Proteins mittels ChIP aber keinen Beweis dafür darstellt, dass das immunpräzipitierte Protein direkt an DNA bindet, sollte dieser Diskrepanz in weiteren Experimenten nachgegangen werden.

Des Weiteren könnte mittels ChIP und anschließender Sequenzierung der präzipitierten DNA (ChIP-Seq) untersucht werden, an welchen Stellen im Genom Sp2 zu finden ist. Interessant wäre hierbei auch, welche Unterschiede es dabei zwischen den verschiedenen Sp-Faktoren gibt, da anhand der DNA-Bindungsspezifität keine unterschiedlichen Präferenzen für Sp-Bindungsstellen im Genom vorhergesagt werden können.

---

## **4.2 Potentielle Interaktionspartner von Sp2**

### **4.2.1 Säulenchromatographie**

Da sich durch die Untersuchungen zum DNA-Bindungsverhalten von Sp2 Hinweise darauf ergeben hatten, dass Sp2 mit anderen Proteinen interagiert, sollte diese Vermutung direkt getestet werden. Dazu wurden Größenfraktionierungen mittels Säulenchromatographie über eine Superose 6 Säule durchgeführt. Dabei durchlaufen große Proteine oder Proteinkomplexe das Säulenmaterial schneller, während kleinere Proteine durch Poren im Säulenmaterial „abgebremst“ werden. Nach dem Durchlaufen der Säule werden Fraktionen gesammelt und die darin enthaltenen Proteine mittels Western Blot analysiert. Monomere Proteine findet man dann in denjenigen Fraktionen, die in etwa dem Molekulargewicht des betreffenden Proteins entsprechen. Geht ein Protein Interaktionen mit anderen Proteinen oder Proteinkomplexen ein, findet man es in entsprechend größeren Fraktionen. Unter den hier verwendeten Bedingungen wurden Fraktionen erhalten, die eine Auftrennung zwischen 1,8 MDa und 60 kDa ermöglichten.

Sp2 besitzt ein Molekulargewicht von etwa 80 kDa, daher erwartet man monomeres Sp2 in den entsprechenden niedermolekularen Fraktionen. Bei Interaktion mit einem weiteren Protein würde man erwarten, dass der Sp2 Peak entsprechend nach oben verschoben ist bzw. dass es zwei Peaks gibt. Überraschenderweise wurde Sp2 unter physiologischen Bedingungen gleichmäßig in allen Fraktionen nachgewiesen. Dieser Befund deutet darauf hin, dass Sp2 Interaktionen mit verschiedenen Proteinen oder Proteinkomplexen eingeht, sodass sich mehrere Peaks überlagern und Sp2 in allen Fraktionen nachgewiesen wird. Sp1 und Sp3, die aufgrund ihrer engen Verwandtschaft und ihrer vergleichbaren Größe als Kontrollen dienten, verließen die Säule dagegen vorwiegend als Monomer, wobei die langen Isoformen von Sp3 ein bis zwei Fraktionen früher auftraten als die kurzen Isoformen. Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass Sp2 nicht aufgrund technischer Probleme in allen Fraktionen nachgewiesen wurde, sondern sich tatsächlich anders verhält als Sp1 und Sp3.

Um zu untersuchen, wie stabil die von Sp2 eingegangenen Protein-Protein Interaktionen sind, wurde die Salzkonzentration im Kernextrakt auf 420 mM erhöht. Unter diesen Bedingungen durchläuft Sp2 die Säule überwiegend als Monomer,

sodass man Sp2 in den gleichen Fraktionen findet wie Sp1 und Sp3. Sp2 scheint also kein Bestandteil stabiler Komplexe zu sein.

Um zu testen, ob das in EMSAs beobachtete „Schmier“ von Gal4-Sp2 Fusionsproteinen auf das Vorhandensein von Protein-Protein Interaktionen zurück zu führen sein kann, wurde Gal4-Sp2 (6-215) in HEK293 Zellen exprimiert und Kernextrakte einer Säulenchromatographie unterzogen. Im Vergleich zu Gal4-Sp1 (1-186) findet sich auch Gal4-Sp2 (6-215) in höhermolekularen Fraktionen. Dieser Effekt ist ebenfalls durch die Erhöhung der Salzkonzentration im Kernextrakt reversibel. Zusätzlich wurden HEK293 Extrakte unter EMSA-Bedingungen hergestellt und über eine Superose 6 Säule fraktioniert. Dabei zeigte sich, dass Sp2 nach Reduktion der Salzkonzentration von 420 mM auf 145 mM wieder in höhermolekularen Fraktionen nachgewiesen werden konnte. Die Reduktion der Salzkonzentration erlaubt also offenbar, dass Interaktionen zwischen Sp2 und anderen Proteinen wieder eingegangen werden können. Demzufolge ist es möglich, dass das Verhalten sowohl von volle-Länge Sp2 als auch von Gal4-Sp2 Fusionsproteinen, die im EMSA nicht an DNA binden bzw. ein ungewöhnliches Laufverhalten aufweisen, auf die Interaktion von Sp2 mit anderen Proteinen zurück zu führen ist.

Um die physiologische Bedeutung solcher Interaktionen verstehen zu können, müssen diese Interaktionspartner zunächst identifiziert werden. Als Kandidaten kommen E2F1, das mit Sp1, Sp2, Sp3 und Sp4 interagieren kann, und KLF6, das zusammen mit Sp2 einen inhibitorischen Komplex am MMP9 Promotor bilden soll, in Frage (Rotheneder et al., 1999, Das et al., 2006).

#### **4.2.2 Hefe-zwei-Hybrid System**

Zur Identifikation von potentiellen Interaktionspartnern von Sp2 sollte das Hefe-zwei-Hybrid System (*yeast two hybrid*, Y2H) angewandt werden. Da es aus den in dieser Arbeit durchgeführten DNA-Bindungsstudien Hinweise gab, dass sich Interaktionsdomänen sowohl im Bereich von AS 1-112 als auch zwischen AS 337 und 448 befinden, sollten diese beiden Bereiche im Hefe-zwei-Hybrid System getestet werden. Dazu mussten zunächst Expressionsvektoren für die zu untersuchenden Sp2-Fragmente hergestellt und in Hefe auf Expression der Gal4-BD-Sp2 Fusionsproteine untersucht werden. Getestet wurden die beiden Vektoren pGBKT7 und pFBT9, die üblicherweise für derartige Studien verwendet werden.

Überraschenderweise war die Expression von keinem der Sp2-Konstrukte mittels Western Blot nachweisbar. Im Gegensatz dazu war nach Transformation von pFBT9-Gal4-BD-SUMO1 das entsprechende Gal4-BD-SUMO1 Fusionsprotein problemlos nachweisbar. Dieses Fusionsprotein hat ein ähnliches Molekulargewicht wie die beiden verwendeten Gal4-BD-Sp2 Fusionsproteine. Da der Vektor pFBT9 also grundsätzlich im verwendeten Hefestamm zur Expression eines Fusionsproteins in dieser Größenordnung benutzt werden konnte, wurde er auch ohne Proteinnachweis verwendet. Möglicherweise befand sich das Expressionsniveau der Gal4-BD-Sp2 Fusionsproteine unterhalb der Nachweisgrenze. Eine wichtige Anmerkung in diesem Zusammenhang ist, dass sich unter den durch das Hefe-zwei-Hybrid System identifizierten Proteinen COPS5 befand. Von diesem Protein ist bekannt, dass es mit der Gal4-DNA-bindenden Domäne interagiert und daher häufig als potentieller Interaktionspartner von Gal4-BD-Fusionsproteinen identifiziert wurde (Nordgard et al., 2001). Die Identifikation von COPS5 kann somit als interne Kontrolle für die Expression von Gal4-BD-Sp2 (1-112) gewertet werden, auch wenn der Nachweis mittels Western Blot nicht möglich gewesen war. Dementsprechend ist es sehr wahrscheinlich, dass Gal4-BD-Sp2 (337-448) ebenfalls exprimiert wurde.

Für das Hefe-zwei-Hybrid Screening wurde eine kommerziell erhältliche, universelle, normalisierte, humane cDNA Bibliothek verwendet, die sich im Vektor pGADT7-RecAB befindet (Mate & Plate Library – Universal Human (Normalized); Clontech). Außerdem ist diese Bibliothek bereits in Hefe transformiert, sodass die Kombination der Bibliothek mit Gal4-BD-Sp2 (1-112) oder Gal4-BD-Sp2 (337-448) durch Mating der entsprechenden Hefezellen erfolgte. Anschließend wurden aus dem Mating resultierende Diploide auf Selektionsmedium ausplattiert und auf Interaktion getestet. Die in der Bibliothek enthaltenen cDNA sollte laut Herstellerangabe ausschließlich aus vollständiger mRNA hergestellt worden sein. Dennoch wurden über das Screening insgesamt acht Plasmide isoliert, die genomische Sequenzen enthielten, die keiner bekannten mRNA zugeordnet werden konnten. Hinzu kamen 18 Plasmide, die ausschließlich 3'untranslatierte Bereiche enthielten. Die Bedeutung dieser Treffer ist unklar, da es eine sehr unwahrscheinliche Möglichkeit ist, dass ausgehend von diesen Konstrukten tatsächlich Proteine exprimiert werden, die dann mit Sp2 interagieren. Dementsprechend wurden diese Treffer nicht weiter analysiert.

Des Weiteren wurden sechs Plasmide isoliert, die für Teile von cytoplasmatischen Proteinen kodieren. Es ist denkbar, dass diese Interaktionen im Hefe-zwei-Hybrid

System tatsächlich stattfinden. Allerdings ist es sehr unwahrscheinlich, dass sie unter physiologischen Bedingungen in der Zelle ebenfalls auftreten, da sich Sp2 im Zellkern befindet. Auch diese Proteine wurden daher nicht weiter untersucht.

Übrig blieben acht Plasmide, die für sechs verschiedene Kernproteine sowie den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 1B (zwei verschiedene Plasmide) kodierten und auch tatsächliche kodierende Sequenzen enthielten. Diese wurden zusammen mit Gal4-BD oder Gal4-BD-Sp2 (1-112) bzw. Gal4-BD-Sp2 (337-448) in Hefe transformiert und auf Interaktion getestet. In diesem Validierungsexperiment interagierten drei Proteine (ZNF350, RNF2 und SPHAR) bereits mit Gal4-BD allein. Zwei weitere Proteine (PHF11 und EIF1b) interagierten weder mit Gal4-BD noch mit Gal4-BD-Sp2 (1-112) bzw. Gal4-BD-Sp2 (337-448). Bestätigt wurden spezifische Interaktionen zwischen Sp2 (337-448) und RNF197 sowie RACK1.

Zur Funktion des Ring Finger Protein 197 (RNF197, cell growth regulator with ring finger domain 1 (CGRRF1)) ist gegenwärtig keine Literatur vorhanden.

Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1) gehört zur Familie der WD40 Proteine, deren Mitglieder in Prokaryoten und allen Eukaryoten zu finden sind und die in fast allen Signalkaskaden eine Rolle spielen. Die WD40 Domänen (WD-repeats) vermitteln die Interaktion mit anderen Proteinen, wobei mehrere WD40 Domänen in einem Protein eine propellerartige räumliche Anordnung einnehmen, so dass ein WD40 Protein gleichzeitig mit mehreren Proteinen interagieren kann. Möglich sind auch Homodimere, die dann noch mehr Interaktionsfläche bieten. RACK1 ist stark konserviert, besitzt 7 WD-repeats und weist eine signifikante Homologie zur G-Protein  $\beta$  Untereinheit auf. RACK1 fungiert als Interaktionsplattform für die Integration von zellulären Signalen und ist daher in der Lage, Interaktionen mit einer Vielzahl von Proteinen einzugehen. Zur Zeit sind 80 Interaktionspartner von RACK1 beschrieben, wobei diese Interaktionen sowohl direkt als auch indirekt sein können. RACK1 ist essentiell für grundlegende Vorgänge wie Proliferation, Transkription und Proteinsynthese (Übersicht in Adams et al., 2011). Die Interaktion mit RACK1 dient häufig der Modulation der enzymatischen Aktivität der Interaktionspartner, die entweder gefördert oder inhibiert werden kann. Beispielsweise stabilisiert die Interaktion von RACK1 mit Protein Phosphatase 2A (PP2A) und Protein Kinase C (PKC) die Aktivität beider Enzyme (Kiely et al., 2006; Kiely et al., 2008; Ron et al., 1994; Ron et al., 1999; Stebbins und Mochly-Rosen 2001). Im Gegensatz dazu kann die Interaktion von RACK1 mit der Thyrosin Kinase Src zur Inaktivierung der Kinase

führen (Mamidipudi et al., 2004a, Mamidipudi et al., 2004b). Auch an der Regulation der Transkription ist RACK1 beteiligt. So interagiert RACK1 mit dem Androgen-Rezeptor (AR) und reprimiert nach Aktivierung der PKC-Signalkaskade die Androgen-induzierte Transaktivierung von AR-responsiven Genen (Rigas et al., 2003). Des Weiteren wird berichtet, dass Src in Abhängigkeit von RACK1 und Androgen mit dem Androgen Rezeptor interagiert, was zur Phosphorylierung des AR und damit zu transkriptioneller Inaktivität führt (Kraus et al., 2006). Auch für die Transkriptionsfaktoren p73 und NFAT wurden Interaktionen mit RACK1 beschrieben, die zur Repression der Transaktivierung führen (Han et al., 2002; Ozaki et al., 2003). Es wäre also vorstellbar, dass auch Sp2 mit RACK1 interagiert, möglicherweise um Kontakt zu Kinasen herzustellen, die Sp2 phosphorylieren.

Die im Hefe-zwei-Hybrid System identifizierten Interaktionen zwischen Sp2 und RNF197 bzw. RACK1 sollten unter Verwendung zusätzlicher Methoden validiert werden. Dazu wurden Sp2, RNF197 und RACK1 zunächst durch gekoppelte in-vitro Transkription/Translation (IVT) hergestellt und anschließend mittels Co-Immunpräzipitation auf Interaktion getestet. Der Vektor pGADT7-RecAB ist so konstruiert, dass Fusionsproteine mit N-terminalem HA-Epitop exprimiert werden, deren Nachweis dann durch einen  $\alpha$ HA-Antikörper erfolgen kann. Im Anschluss an die IVT wurde Sp2 mit HA-RNF197 sowie mit HA-RACK1 inkubiert und anschließend eine Immunpräzipitation mit einem  $\alpha$ HA-Antikörper durchgeführt. HA-RNF197 konnte im Western Blot nicht nachgewiesen werden. Dennoch war Sp2 in allen drei Proben (Input, Überstand, Präzipitat) vorhanden, was ein starker Hinweis darauf ist, dass Sp2 unter den getesteten Bedingungen unspezifisch an die Matrix (Protein G Sepharose) bindet. Auch in allen drei HA-RACK1 Proben wurde Sp2 nachgewiesen. Wegen der beobachteten unspezifischen Bindung an die Matrix konnte aber weder auf eine Interaktion zwischen Sp2 und RACK1 geschlossen werden, noch konnte sie ausgeschlossen werden (vgl. Abb. 3.3.2 A). Daraufhin wurden Sp2 und HA-RACK1 mittels IVT hergestellt, inkubiert und Immunpräzipitationen sowohl mit  $\alpha$ RACK1-Antikörper als auch mit  $\alpha$ Sp2 Antikörper durchgeführt. Die Präzipitation von Sp2 war effizient, jedoch konnte HA-RACK1 ausschließlich in Input und Überstand nachgewiesen werden. Eine Präzipitation von HA-RACK1 mit dem  $\alpha$ RACK1 Antikörper war nicht nachweisbar. Zudem wurde auch hier eine starke unspezifische Bindung von Sp2 an die Protein G Sepharose beobachtet (vgl. Abb. 3.3.2 B). Zusätzlich wurde versucht, die Interaktion zwischen RACK1 und Sp2 durch



Überexpression von Myc-RACK1 und Sp2-3xFlag in HEK293 Zellen und anschließende Immunpräzipitation von Sp2-3xFlag mit einer  $\alpha$ Flag-Matrix nachzuweisen. Auch mit dieser Methode war es nicht möglich, die Interaktion zwischen Sp2 und RACK1 zu bestätigen, sowohl endogenes RACK1 als auch Myc-RACK1 wurden ausschließlich in Input und Überstand nachgewiesen (vgl. Abb. 3.3.2 C). Die durch das Hefe-zwei-Hybrid Screening identifizierten Interaktionen zwischen Sp2 und RNF197 bzw. RACK1 konnten also nicht durch Co-Immunpräzipitationen validiert werden

#### **4.2.3 Co-Immunpräzipitation und Massenspektrometrie**

Da der Versuch, Interaktionspartner von Sp2 mittels Hefe-zwei-Hybrid Screening zu finden, keine validierbaren Treffer geliefert hatte, sollten interagierende Proteine mittels Co-Immunpräzipitation und anschließender Massenspektrometrie identifiziert werden. Dazu wurden HEK293 Zellen stabil mit Sp2-3xFlag transfiziert, Extrakte hergestellt und über eine  $\alpha$ Flag-Matrix aufgereinigt. Da aufgrund der Ergebnisse der Säulenchromatographien angenommen worden war, dass die Interaktionen zwischen Sp2 und anderen Proteinen durch Erhöhung der Salzkonzentration und möglicherweise auch durch Detergenzien leicht aufgehoben werden können, wurden relativ milde Waschbedingungen verwendet (20 mM Tris/Cl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100 oder 0,05% NP-40 vgl. 2.4.6). Im Anschluss wurden Sp2-3xFlag und interagierende Proteine von der Matrix eluiert. Die Elution wurde durchgeführt um zu vermeiden, dass Proteine als Interaktionspartner von Sp2 identifiziert werden, die unspezifisch an die  $\alpha$ Flag-Matrix binden. Die weitere Aufbereitung und Analyse der Proben erfolgte in der Massenspektrometrie-Einheit des Erasmus Medical Center in Rotterdam. Die in den Elutionen enthaltenen Proteine wurden dort mittels SDS-PAGE separiert und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Um eine möglichst hohe Auflösung zu erreichen, wurden nicht einzelne Banden aus dem Gel ausgeschnitten, sondern die gesamte Spur verwendet. Diese wurde in Scheiben geschnitten, die dann jeweils als einzelne Probe weiter aufbereitet und schließlich der Analyse mittels Massenspektrometrie unterzogen wurden. Die erhaltenen Daten wurden dann in Form von Microsoft Excel Dateien zur Verfügung gestellt.

In der Sp2-Probe wurden sehr viele Treffer identifiziert, die auch in der HEK293-Kontrolle gefunden wurden oder die einen nicht-signifikanten Mascot-Wert

aufwiesen. Ebenso gab es zahlreiche Treffer, die spezifisch für die Sp2-Probe waren und einen signifikanten Mascot-Wert besaßen. Da erwartet wurde, dass reale Treffer aus diesem Experiment auch in weiteren Proben gefunden werden sollten, wurde das Experiment wiederholt und dabei neben einem Gesamtzellextrakt auch ein Kernextrakt verwendet. Zusätzlich wurde vor der Kopplung an die  $\alpha$ Flag-Matrix ein Benzonase-Verdau durchgeführt, um Nukleinsäuren abzubauen und so Interaktionen zu eliminieren, die in Abhängigkeit von DNA oder RNA auftreten und zur indirekten Immunpräzipitation von Sp2 führen könnten.

Insgesamt gab es über alle drei Proben 279 Treffer, die spezifisch für Sp2 waren. Darunter waren 29 Proteine, die in zwei der drei Proben gefunden wurden. Dabei werden auch Proteine aufgeführt, die einen Mascot-Wert von unter 40 aufweisen, wenn sie mehrfach identifiziert wurden. Die einzigen beiden Proteine, die in allen drei Proben auftraten, sind Carbamylphosphatesynthetase2/ aspartattranscarbamylase/ dihydroorotase (CAD) und Reticulocalbin-1 (RCN1). Eine Datenbankrecherche ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) hatte ergeben, dass beide Proteine keine Kernproteine sind und keinerlei Verbindung zur Regulation der Transkription aufweisen. CAD ist ein Enzym aus der Pyrimidin-Biosynthese und RCN1 vermittelt vermutlich Calcium-abhängige Reaktionen im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums. Daher wurden weder CAD noch RCN1 in weiterführenden Experimenten analysiert. Eine Literaturrecherche während des Verfassens dieser Arbeit ergab allerdings, dass es Berichte gibt, wonach CAD auch im Zellkern nachgewiesen wurde. Chaparian und Evans (1988) beschrieben, dass CAD im Cytoplasma lokalisiert und fast komplett aus dem Nukleus ausgeschlossen ist. In Adenovirus-infizierten Zellen wurde eine Interaktion von CAD mit dem viralen Vorläufer des Terminationsproteins (pTP) beschrieben (Angletti und Engler 1998). Adenovirale Replikationskomplexe entstehen aufgrund einer Interaktion von pTP mit zellulären Proteinen an der Kernmatrix. Unter diesen zellulären Proteinen wurde CAD identifiziert, dessen Vorhandensein zusammen mit pTP an Stellen aktiver Transkription nachgewiesen wurde (Angletti und Engler 1998). Eine genaue Analyse der subzellulären Lokalisation von CAD (Sigoillot et al., 2005) zeigte, dass sich CAD in ruhenden Zellen zum größten Teil im Cytoplasma befindet. Nach Induktion der Proliferation wurde CAD auch im Nukleus nachgewiesen. Dabei handelte es sich um die durch MAP Kinase phosphorylierte, aktivierte Form der CAD (Thr(P)-456 CAD), die sich an der Kernmatrix befand. Die Transfektion mit einer CAD-Variante, die nicht in den

Nukleus importiert werden konnte, verlangsamte die Proliferation der Zellen. Die Autoren schlussfolgerten daher, dass es für die Proliferation von Zellen wichtig ist, dass sich aktivierte CAD in der Nähe aktiver Replikationskomplexe befindet, damit Nukleotide für die DNA-Synthese geliefert werden können (Sigoillot et al., 2005). Es wäre von großem Interesse, die mögliche Interaktion zwischen CAD und Sp2 in zukünftigen Experimenten zu untersuchen, zumal auch für Sp2 eine Assoziation mit der Kernmatrix beschrieben wurde (Moorefield et al., 2006).

Nicht mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden E2F1 und KLF6, zwei Transkriptionsfaktoren, für die eine Interaktion mit Sp2 berichtet worden war (Rotheneder et al., 1999; Das et al., 2006). Außerdem wurde keines der Proteine identifiziert, die mittels Hefe-zwei-Hybrid Screening als potentielle Interaktionspartner von Sp2 gefunden wurden.

Eine genaue Analyse der Proteine, die in zwei der drei Proben nachgewiesen worden waren, mittels Datenbankrecherche ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) zeigte, dass einige von ihnen in einem funktionellen Zusammenhang stehen. So wurde eine Gruppe von Proteinen identifiziert, die an der Prozessierung von mRNA beteiligt sind: BAT2 und HNRNPA1, die direkt miteinander interagieren, wurden in Experiment 1 und 2 (E1 und E2) in den Zellextrakten nachgewiesen. Jeweils in Zellextrakt (ZE) und Kernextrakt (KE) des 2. Experiments, also nach Benzonase-Behandlung, wurden HNRNPK, HNRNPH2 und SF3B4 identifiziert. Bei HNRNPA1 und HNRNPK handelt es sich zudem um Untereinheiten des Spliceosome C Komplexes. Zwei weitere Untereinheiten dieses Komplexes wurden in jeweils einer Probe nachgewiesen. Dabei handelt es sich um HNRNPA2B1 (E2 KE) und THOC4 (E2 ZE).

Des Weiteren wurden einige transkriptionelle Repressoren identifiziert: E2F6 (E1 ZE und E2 ZE), NCOR2 (E2 ZE und KE), PCGF6 (E1 und E2 ZE), TRIM28 (E1 ZE und E2 KE) und RBBP4 (E1 ZE und E2 ZE). RBBP4 ist Bestandteil einer Reihe von Komplexen, darunter der NuRD Komplex. Ebenfalls Bestandteil des NuRD Komplexes sind HDAC2 (E1 ZE) und CHD4 (E2 KE), die in jeweils einer Probe identifiziert wurden.

In beiden Zellextrakten (E1 + E2) wurden zudem SMC4 und CDK1 nachgewiesen, wobei SMC4 durch CDK1 phosphoryliert wird. Schließlich wurden zwei regulatorische Untereinheiten der Serin/Threonin Protein Phosphatase 2A gefunden (PPP2R2A (E1 und E2 ZE) und PPP2R5C (E2 ZE und KE). Da es sich bei Sp2 um

ein phosphoryliertes Protein handelt (Dephoure et al., 2008), wäre eine Dephosphorylierung von Sp2 durch PPP2A möglich.

Da es sich bei E2F6 und RBBP4 um interessante Kandidaten handelte, für die Antikörper verfügbar waren, wurden diese beiden Proteine ausgewählt, um ihre Interaktionen mit Sp2 zu validieren. Dazu wurde zunächst eine Immunpräzipitation von endogenem Sp2 aus HEK293 Gesamtzellextrakten durchgeführt. E2F6 war im Western Blot aufgrund technischer Probleme mit dem Antikörper, der unter allen getesteten Bedingungen eine starke Hintergrundfärbung verursachte, nicht nachweisbar. Daher konnte eine Interaktion mit Sp2 weder bestätigt noch widerlegt werden. RBBP4 besitzt ein Molekulargewicht von 55 kDa und läuft damit im SDS-PAA Gel auf der gleichen Höhe wie die schweren Ketten der für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörper. Da ein mögliches RBBP4-Signal durch das starke Antikörper-Signal überlagert wurde, konnte trotz effizienter Immunpräzipitation von Sp2 nicht beurteilt werden, ob eine Interaktion zwischen Sp2 und RBBP4 stattfand (vgl. Abb. 3.4.4 A). Auch nach Immunpräzipitation von RBBP4 konnte keine Interaktion mit Sp2 nachgewiesen werden. Allerdings konnte wegen der oben genannten Problematik die Effizienz der Immunpräzipitation nicht getestet werden (vgl. Abb. 3.4.4 B). Um dieses Problem zu umgehen, wurden Gesamtzellextrakte aus mit Sp2-3xFlag stabil transfizierten HEK293 Zellen hergestellt und über eine  $\alpha$ Flag-Matrix aufgereinigt. Anschließend wurde Sp2-3xFlag mit einem 3xFlag Peptid von der Matrix eluiert. Man erwartet also, dass Interaktionspartner von Sp2 ebenfalls in der Elution nachweisbar sind und spezifische Signale somit nicht von Antikörper-Signalen überlagert werden. Allerdings war RBBP4 ausschließlich in Input und Überstand nachweisbar, so dass es auch aus diesem Experiment keinen Hinweis auf eine Interaktion zwischen Sp2 und RBBP4 gibt (vgl. Abb. 3.4.4 C).

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, alle potentiellen Interaktionspartner im Detail zu analysieren. Für zukünftige Experimente gibt es einige Ansatzpunkte, wie die Probenaufreinigung optimiert und so das Auftreten unspezifischer Proteine verringert werden könnte. Das verwendete „Batch“-Verfahren, das ausgewählt worden war, weil dabei beliebig große Volumina eingesetzt werden können, hat jedoch einige Nachteile. Bei jedem Waschschrift wird die Matrix zunächst durch Zentrifugation sedimentiert und der Waschpuffer dann aus dem Probenröhrchen oberhalb der Matrix abgesaugt. Dabei kann nicht vermieden werden, dass Matrix-

Material verloren geht. Gleichzeitig kann der Puffer nicht vollständig entfernt werden, so dass auch darin gelöste Proteine nicht vollständig aus der Probe entfernt werden. Die Effizienz der Waschschr tte könnte daher durch Verwendung einer Zentrifugationssäule optimiert werden (Brymora et al., 2004). Zusätzlich könnte das Bettvolumen der Matrix verringert werden, wodurch ebenfalls die Effizienz des Waschens erhöht werden soll (Brymora et al., 2004).

Um zu verhindern, dass spezifische Interaktionen während der Zelllyse und der Waschschr tte verloren gehen, könnten zudem Reagenzien eingesetzt werden, die Proteine, die sich aufgrund einer Interaktion in großer räumlicher Nähe zueinander befinden, kovalent miteinander vernetzen, wie z.B. Formaldehyd (Sinz 2010). Auf diese Weise könnten unspezifisch bindende Proteine effizient entfernt werden, ohne dass die Interaktionen zwischen Sp2 und seinen Interaktionspartnern verloren gingen. Außerdem könnte diese kovalente Vernetzung mit „*stable isotope labeling using amino acids in cell culture*“ (SILAC) (Ong et al., 2002) kombiniert werden. Dabei wird eine Population von Zellen mit normalem, „leichtem“, Medium versorgt, während eine andere Population in Medium kultiviert wird, das „schwere“, d.h.  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierte, essentielle Aminosäuren (z.B. Leucin oder Arginin) enthält. Diese „schweren“ Aminosäuren sind dann nach einiger Zeit in allen in der Zelle vorhandenen Proteinen enthalten. Diese Methode ermöglicht einen quantitativen Vergleich von Proteinen in beiden Proben, wodurch unspezifische Proteine erkannt und heraus gefiltert werden können. Konkret könnte man HEK293 Zellen in „leichtem“ Medium kultivieren, während HEK293 Zellen, die mit Sp2-3xFlag stabil transfiziert wurden, in „schwerem“ Medium kultiviert werden. Vor der Lyse würden die Zellen mit Formaldehyd behandelt und Lysate aus beiden Populationen zu gleichen Teilen gemischt. Dann würde eine Flag-Aufreinigung mit anschließender Elution durchgeführt und die Proben schließlich mittels Massenspektrometrie untersucht. Dabei können „schwere“ und „leichte“ Proteine unterschieden und quantifiziert werden. Bei den Proteinen, die in gleicher Menge mit „leichten“ und „schweren“ Aminosäuren vorkommen, handelt es sich um unspezifischen Hintergrund, während Interaktionspartner von Sp2 in der „schweren“ Probe angereichert werden würden. SILAC hat also den Vorteil, dass unspezifische Proteine effizient erkannt und eliminiert werden können.

Ein weiteres mögliches Problem neben der Aufreinigung der Proben ist die Verwendung von Sp2-3xFlag. Während es sich in den Säulenchromatographien, die

zur Kontrolle durchgeführt worden waren, genauso verhalten hatte, wie endogenes Sp2 und in allen Fraktionen gefunden worden war, gibt es mittlerweile Hinweise, dass Sp2-3xFlag die Funktion von Sp2 *in vivo* nicht ersetzen kann. So konnte der Wachstumsdefekt von MEFs nach Inaktivierung des Sp2-Gens nicht durch Sp2-3xFlag, sondern nur durch Sp2 ohne Flag-Epitop aufgehoben werden (Sadic 2009). Allerdings spielte dabei auch das Expressionsniveau von Sp2 eine Rolle, so dass nicht eindeutig festgestellt werden konnte, ob das Flag-Epitop ursächlich war oder die Überexpression von Sp2-3xFlag. Dennoch ist es möglich, dass das C-terminale Flag-Epitop, das sich direkt hinter den Zinkfingern befindet, die Interaktion mit anderen Proteinen stört. So wurde berichtet, dass sich die Domäne für die Interaktion von Sp1, Sp2, Sp3 und Sp4 mit E2F1 zwischen den ersten beiden Zinkfingern der Sp-Faktoren befindet (Rotheneder et al., 1999). Es wäre durchaus denkbar, dass weitere Proteine mit der Zinkfingerregion interagieren und dass diese Interaktionen durch das C-terminale Flag-Epitop gestört werden. Für weitere Experimente sollte also zusätzlich ein N-terminales Epitop verwendet werden.

### **4.3 Subzelluläre Lokalisation von Sp2 Protein**

Die subzelluläre Lokalisation von Sp2 Protein wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung in HEK293 Zellen und in MEFs untersucht. Sowohl endogenes Sp2 als auch mSp2-3xFlag wurden mit spezifischen Antikörpern im Zellkern von HEK293 Zellen nachgewiesen. Auch in MEFs befindet sich Sp2 im Zellkern. Der verwendete polyklonale Antikörper (Baur 2005) weist allerdings auch eine Kreuzreaktivität mit einem cytoplasmatischen Protein auf, die auch in Western Blots beobachtet werden kann (vgl. Abb. 3.6.1 C). Dieses kreuzreagierende Protein besitzt ein etwas geringeres Molekulargewicht als Sp2, sodass eine besonders lange Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel erforderlich ist, um beide Banden darzustellen. Um welches Protein es sich dabei handelt, ist unbekannt. Hierbei ist anzumerken, dass der kommerziell erhältliche Antikörper ( $\alpha$ Sp2 K20, Santa Cruz) entgegen der Herstellerangabe kein murines Sp2 erkennt (vgl. Abb. 2.2.9). Die Verwendung dieses Antikörpers stellt also keine Alternative dar, um die beschriebene Kreuzreaktivität zu umgehen.

Die Verteilung von Sp2 im Zellkern ist, von den Nukleoli abgesehen, gleichmäßig. Im Gegensatz zur in dieser Arbeit unter Verwendung von drei unabhängigen Antikörpern

in zwei verschiedenen Zelllinien beobachteten homogenen Verteilung von endogenem humanem und murinem Sp2 sowie mSp2-3xFlag im Zellkern berichten Moorefield et al. (2006), dass Sp2 in subnuklearen Foci lokalisiert sei. Allerdings wurden diese Analysen mit überexprimiertem HA-Sp2 und YFP-Sp2 durchgeführt, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei den beobachteten Sp2-Foci um Artefakte handelt, die auf die starke Überexpression von Sp2 zurückzuführen sind.

Eine Färbung von Mausgeweben mit dem in diesem Labor hergestellten  $\alpha$ Sp2-Antikörper (Baur 2005) war nicht möglich, da dabei ausschließlich eine cytoplasmatische Färbung auftrat (persönliche Kommunikation Prof. Dr. H.-P. Elsässer), die höchstwahrscheinlich auf die beschriebene Kreuzreaktivität des  $\alpha$ Sp2-Antikörpers in Mauszellen zurück zu führen ist. Möglicherweise liegt die Expression von Sp2 in differenzierten Geweben unterhalb des Detektionslimits, während Sp2 in Mausembryonen, murinen embryonalen Fibroblasten und etablierten Zelllinien, wie HEK, Ishikawa, HeLa oder SaOs, so stark exprimiert wird, dass ein Nachweis mittels Western Blot oder Immunfluoreszenz problemlos möglich ist (diese Arbeit und Baur 2005, Neubert 2011). Zudem gibt es Berichte, dass das Expressionsniveau von Sp2 während der Entstehung von Prostatacarcinomen und Papillomen in der Haut zunimmt, während es in gesunden Geweben nicht nachgewiesen werden konnte (Phan et al., 2004 und Kim et al., 2010). Möglicherweise fördert Sp2 sogar die Entstehung von Tumoren, da die Überexpression von Sp2 in der Haut die Tumorfrequenz nach einer TPA/DMBA-Behandlung signifikant erhöht (Kim et al., 2010). Die Beobachtung, dass Sp2 vor allem in nicht ausdifferenzierten Zellen und Tumorzellen exprimiert wird, deutet darauf hin, dass Sp2 eine Rolle bei der Zellteilung spielt. Weiter unterstützt wird diese Hypothese, dadurch, dass der knock-down von Sp2 mittels siRNA zu mitotischen Defekten in HeLa Zellen führte (Neumann et al., 2010).

---

## **4.4 Funktion von Sp2 in der Maus**

### **4.4.1 Phänotypen von MEFs**

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung der Funktion von Sp2 im Mausmodell. Da der Sp2ko/ko Phänotyp letal ist und Sp2ko/ko Embryonen bereits um Tag 10 der Embryonalentwicklung (E10) sterben, sollten aus Sp2ko/ko Embryonen an E9,5 MEFs hergestellt und kultiviert werden, um eine Untersuchung der Funktion von Sp2 Protein in einem in-vivo System zu ermöglichen. Überraschenderweise war es jedoch nicht möglich, Sp2ko/ko MEFs zu kultivieren. Während MEFs aus Sp2wt/wt und Sp2wt/ko Wurfgeschwistern problemlos auf den Zellkulturschalen anwuchsen und proliferierten, setzten sich nur wenige Sp2ko/ko Zellen auf den Zellkulturschalen fest. Diese nahmen eine sehr ausgebreitete, flache Form an, die an seneszente Zellen erinnerte, und proliferierten nicht. Bei der Präparation war darauf geachtet worden, dass die verwendeten Embryonen einen Herzschlag aufwiesen. Die Unfähigkeit MEFs zu bilden, konnte also nicht darauf beruhen, dass diese Embryonen bereits tot gewesen wären. Es wäre aber denkbar, dass E9,5 Sp2ko/ko Embryonen aufgrund ihrer Wachstumsretardation zu klein sind und daher nicht genug Zellen für die Herstellung von MEFs vorhanden waren. Falls die zu geringe Größe der Embryonen der Grund wäre, weshalb keine Sp2ko/ko MEFs etabliert werden konnten, sollte es möglich sein, MEFs aus E13,5 Sp2lzn/lzn Embryonen herzustellen. Der Sp2lzn/lzn Phänotyp ist ebenfalls letal, im Gegensatz zu Sp2ko/ko Embryonen unterscheiden sich Sp2lzn/lzn Embryonen zu diesem Zeitpunkt aber noch nicht signifikant von ihren Wurfgeschwistern (Baur 2005). MEFs aller drei Genotypen (Sp2wt/wt, Sp2wt/lzn, Sp2lzn/lzn) wuchsen zunächst problemlos an. Jedoch starben Sp2lzn/lzn MEFs nach der 1. Passage ab, während die aus den Wurfgeschwistern isolierten MEFs weiter kultiviert werden konnten. Der Grund für das plötzliche Absterben der Sp2lzn/lzn Zellen ist unbekannt. Möglicherweise werden nach dem Passagieren der Zellen Programme benötigt, die von Sp2 abhängen und daher in Sp2lzn/lzn MEFs nicht gestartet werden können.

Der deutliche Unterschied im Phänotyp von Sp2ko/ko- und Sp2lzn/lzn- Embryonen und MEFs war unerwartet, da man davon ausgegangen war, dass durch die Insertion der Selektionskassette in das Sp2 Gen ein funktioneller knock-out erhalten werden würde. Allerdings werden ausgehend vom Sp2lzn Allel die Exons 1 bis 3 zusammen mit der Selektionskassette transkribiert, wie der Nachweis einer entsprechenden



mRNA belegte (Baur 2005). Wahrscheinlich entsteht daraus eine trunkierte Form von Sp2, die auf Proteinebene den Verlust von volle-Länge Sp2 teilweise kompensieren kann, sodass der Sp2<sup>lzn/lzn</sup> Phänotyp milder ist als der Sp2<sup>ko/ko</sup> Phänotyp. Diese putative trunkierte Form von Sp2 konnte allerdings mittels Western Blot nicht nachgewiesen werden, möglicherweise liegt das Expressionsniveau unterhalb der Nachweisgrenze (vgl. Abb. 3.6.2.1 C).

Die Beobachtung, dass MEFs ohne intaktes Sp2-Allel nicht kultiviert werden können, ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass der knock-out von Sp2 einen sehr starken, zellautonomen Phänotyp hervorruft und dass Sp2 für die Proliferation von Zellen unerlässlich ist. Um diese Hypothese zu testen, wurden weitere Untersuchungen im Rahmen von Diplomarbeiten initiiert. Auch dabei zeigte sich, dass der Verlust von Sp2 Protein die Proliferation von Zellen stark beeinträchtigt. Zum Einen wurden immortalisierte Sp2<sup>cko/cko</sup> MEFs mit einem Retrovirus infiziert, der für Cre-Rekombinase kodiert, sodass nach erfolgter Infektion das gefloxtete Exon 3 des Sp2 Gens entfernt wurde und Sp2<sup>ko/ko</sup> MEFs entstanden. Diese Zellen wuchsen wie erwartet deutlich langsamer als die Kontrollzellen (Allweiss 2008, Sadic 2009). Des Weiteren wurde ein knock-down von Sp2 in HEK293 Zellen durch Transfektion von zwei verschiedenen Sp2-spezifischen siRNAs herbeigeführt, der ebenfalls in eine deutlich verlangsamte Proliferation resultierte (Neubert 2011).

Einen dem knock-out von Sp2 vergleichbaren Phänotyp ruft die Inaktivierung von Sp1 hervor. Sp1<sup>ko/ko</sup> Embryonen sterben ebenfalls um Tag 10 der Embryonalentwicklung und Sp1<sup>ko/ko</sup> ES-Zellen, die in Wildtyp-Blastozysten injiziert worden waren, waren nach E10 nicht mehr im resultierenden Embryo nachweisbar (Marin et al., 1997). Außerdem war die Proliferation von Sp1<sup>cko/cko</sup> MEFs nach Infektion mit einem Cre-Rekombinase kodierenden Retrovirus so stark verlangsamt bzw. inhibiert, dass nach einigen Tagen nur noch solche MEFs nachweisbar waren, in denen keine Rekombination am Sp1 Locus stattgefunden hatte (Allweiss 2008).

#### **4.4.2 Herstellung einer Sp2<sup>cko</sup>-Mauslinie**

Die Strategie zur Generierung der transgenen Mauslinie war so gewählt worden, dass die Herstellung eines konditionellen knock-outs (cko) ebenfalls möglich ist. Zur Herstellung eines solchen konditionellen knock-outs kann entweder eine Cre-Rekombinase exprimierende Mauslinie, wie z.B. die CAG-Cre Linie (Sakai und Miyazaki, 1997), eingekreuzt werden, oder Cre mRNA kann in Oocyten injiziert

---

werden (de Wit et al., 1998). Im Vorfeld dieser Arbeit war mit beiden Methoden mehrfach erfolglos versucht worden, eine Sp2cko-Mauslinie zu erhalten. Überraschenderweise entstanden dabei ausschließlich die Sp2ko und Sp2kolzn Allele (vgl. Abb. 3.6.3.1 A).

Um dennoch das Sp2cko-Allel zu erhalten, wurde ein *in-vivo* Ansatz gewählt. Dazu wurden MeuCre40 Mäuse, die Cre-Rekombinase in den Morula- und Blastozystenstadien auf niedrigem Niveau exprimieren (Leneuve et al., 2003), mit Sp2wt/lzn Mäusen gekreuzt. Dadurch wurden sogenannte Mosaik-Mäuse erhalten, die in unterschiedlichen Körperzellen verschiedene rekombinierte Allele besitzen können. Diese Mosaik-Mäuse wurden dann mit Wildtyp-Mäusen gekreuzt und die Nachkommen auf Keimbahntransmission des gesuchten Allels getestet. Basierend auf den Ergebnissen von Leneuve et al. (2003) sollten nach der Paarung von Mosaik-Mäusen mit Wildtyp-Mäusen zwei Würfe durchschnittlicher Größe (d.h. etwa 6-8 Nachkommen pro Wurf) ausreichen, um alle drei rekombinierten Allele zu erhalten. Unter 123 Nachkommen aus den Kreuzungen von Mosaik- und Wildtyp-Mäusen wurde eine einzige weibliche Maus gefunden, die das Sp2cko-Allel trug. Diese Maus wurde weiter gekreuzt, um die Sp2cko-Mauslinie zu gründen. Diese Linie kann nun genutzt werden, um Sp2 durch Einkreuzen von Mauslinien, die Cre Rekombinase exprimieren, in spezifischen Geweben, zu bestimmten Zeitpunkten in der Embryonalentwicklung oder induzierbar in gesamten Organismus zu inaktivieren. So kann die Funktion von Sp2 *in vivo* untersucht werden.

Die Beobachtung, dass es ungewöhnlich schwierig ist, das Sp2cko-Allel zu erhalten, könnte darauf hin deuten, dass das Sp2cko-Allel aus unbekannten Gründen instabiler ist, so dass nur in seltenen Fällen ausschließlich die Selektionskassette entfernt wird.

---

### **4.5 Fazit und Ausblick**

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Sp2 für die Embryonalentwicklung von Mäusen sowie die Proliferation von Zellen in Kultur essentiell ist. Die DNA-Bindungseigenschaften von Sp2 sind noch immer nicht aufgeklärt. Es gibt aber starke Hinweise darauf, dass es mindestens drei Motive im Sp2 Protein gibt, die die DNA-Bindung unter den bisher getesteten Bedingungen verhindern. Ebenso gibt es starke Hinweise darauf, dass Sp2 mit anderen Proteinen interagiert und möglicherweise im Zusammenhang mit der Regulation des Zellzyklus steht.

Um die Funktion von Sp2 weiter aufzuklären, könnten Chromatin-Immunpräzipitationen mit anschließender Sequenzierung der präzipitierten DNA (ChIP-Seq) durchgeführt werden, um zu untersuchen, wo im Genom Sp2 zu finden ist. Dabei könnte es sich um Zellzyklus-Gene oder metabolische Gene handeln. Zum Anderen sollte die DNA-Bindung von Sp2 weiter analysiert werden, um zu untersuchen, ob Sp2 unter bestimmten Bedingungen direkt an DNA bindet oder im ChIP indirekt präzipitiert wird.

Des Weiteren sollte die Regulation der Sp2-Expression analysiert werden, um zu untersuchen, ob die Expression von Sp2 mit zunehmender Differenzierung von Zellen reduziert wird und welche Mechanismen dazu führen, dass die Expression in Tumorzellen erhöht ist.

---

## 5. Anhang

### 5.1 Literaturverzeichnis

**Allweiss L (2008);** Untersuchungen zur Expression und Funktion des Transkriptionsfaktors Sp2 in der Maus. *Fachbereich Medizin, Philipps-Universität Marburg*

**Angletti PC, Engler JA (1998);** Adenovirus Preterminal Protein Binds to the CAD Enzyme at Active Sites of Viral DNA Replication on the Nuclear Matrix. *J Virol* 72: 2896-2904

**Baur F (2005);** Transcription factor Sp2: Molecular characterization and generation of Sp2 gene targeted mice. *Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg*

**Baur F, Nau K, Sadic D, Allweiss L, Elsässer HP, Gillemans N, de Wit T, Krüger I, Vollmer M, Philipsen S, Suske G. (2010);** Specificity Protein 2 (Sp2) is Essential for Mouse Development and Autonomous Proliferation of Mouse Embryonic Fibroblasts. *Plos One* 5: A202-A212

**Bouwman P, Göllner H, Elsässer HP, Eckhoff G, Karis A (2000);** Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development. *EMBO J* 19: 655-661

**Bouwman P, Philipsen S (2002);** Regulation of the activity of Sp1 related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 195: 27-38

**Braun H, Ertmer A, Nacht S, Koop R, Suske G (2001);** Transcription factor Sp3 is regulated by acetylation. *Nucleic Acids Res* 29, 4994-5000

**Brymora A, Valova VA, Robinson PJ (2004);** Protein-Protein Interaction Identified by Pull-Down Experiments and Mass Spectrometry. *Current Protocols in Cell Biology* 17.5.1-17.5.51

---

**Chaparian MG, Evans DR (1988);** Intracellular location of the multidomain protein CAD in mammalian cells. *FASEB J* 2: 2982-2989

**Das A, Fernandez-Zapico ME, Cao S, Yao J, Fiorucci S, Hebbel RP, Urrutia R, Shah VH (2006);** Disruption of an Sp2/KLF6 Repression Complex by SHP Is required for Farnesoid X Receptor-induced Endothelial Cell Migration. *JBC* 281;51:39105-39113

**Dephoure N, Zhou C, Villen J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, et al., (2008);** A quantitative atlas of mitotic phosphorylation.

**Dynan WS, Tjian R (1983);** The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35, 79-87

**Festing (1989);** Inbred Strains of Mice. In: Genetic variants and strains of laboratory mouse (Lyona MF und Searle AG). *Oxford University Press, England*

**Gee JE, Blume S, Snyder RC, Ray R, Miller DM (1992);** Triplex Formation Prevents Sp1 binding to the Dihydrofolate Reductase Promoter. *JBC* 267: 11163-11167

**Göllner H, Bouwman P, Mangold M, Karis A, Braun H et al. (2001);** Complex phenotype of mice homozygous for a null mutation in the Sp4 transcription factor gene. *Genes Cells* 6: 689-697

**Hagen G, Müller S, Beato M, Suske G (1992);** Cloning by recognition site screening of two novel GT-box binding proteins: a family of Sp1-related genes. *Nucleic Acids Res* 20: 5519-5525

**Han J, Kim M, Oum JH, Myung H, Lee SW et al., (2002);** RACK-1, a receptor for activated C kinase, interacts with the transcription factor NFAT and represses its transactivation. *Moll Cells* 14: 420-424

**Kiely PA, O`Gorman D, Luong K, Ron D, O`Connor R (2006);** Insulin-like growth factor I controls a mutually exclusive association of RACK1 with protein

---

phosphatase 2A and beta1 integrin to promote cell migration. *Mol Cell Biol* 26: 4041- 4051

**Kiely PA, Baillie GS, Lynch MJ, Houslay MD, O'Connor R (2008);** Tyrosine 302 in RACK1 is essential for insulin-like growth factor-I-mediated competitive binding of PP2A and beta1 integrin and for tumor cell proliferation and migration. *J Biol Chem* 283: 22952-22961

**Kim T-H, Chiera SL, Linder KE, Trempus CS, Smart RC, Horowitz JM (2010);** Overexpression of Transcription Factor Sp2 Inhibits Epidermal Differentiation and Increases Susceptibility to Wound- and Carcinogen-Induced Tumorigenesis. *Cancer Res* 70: 8507-85161

**Kingsley C, Winoto A (1992);** Cloning of GT-box binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 12: 4251-4261

**Kolell KJ, Crawford DL (2002);** Evolution of Sp Transcription Factors. *Mol Biol Evol* 19 (3): 216-222

**Kraus S, Gioeli D, Vomastek T, Gordon V, Weber MJ (2006);** Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1) and Src Regulate the Tyrosine Phosphorylation and Function of the Androgen Receptor. *Cancer Res* 66: 11047-11054

**Leneuve P, Colnot S, Hamard G, Francis F, Niwa-Kawakita M, Giovannini M , Holzenberger M (2003);** Cre-mediated germline mosaicism: a new transgenic mouse for the selective removal of residual markers from tri-lox conditional alleles. *Nucleic Acids Res* 31; e21

**Mamidipudi V, Chang BY, Harte RA, Lee KC, Cartwright CA (2004);** RACK1 inhibits the serum- and anchorage-independent growth of v-Src transformed cells. *FEBS Lett* 567: 321-326

- 
- Mamidipudi V, Zhang J, Lee KC, Cartwright CA (2004);** RACK1 regulates G1/S progression by suppressing Src kinase activity. *Mol Cell Biol* 24: 6788-6798
- Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F, Philipson S (1997);** Transcription factor Sp1 is essential for early development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 89: 619-628
- Martianov I, Ramadass A, Serra Barros A, Chow N, Akoulitchev A (2007);** Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature* 445: 666-670
- Moorefield KS, Fry SJ, Horowitz JM (2004);** Sp2 DNA binding activity and trans-activation are negatively regulated in mammalian cells. *J Biol Chem* 279: 13911-13924
- Moorefield KS, Yin H, Nichols TD, Cathcart C, Simmons SO et al. (2006);** Sp2 localizes to subnuclear foci associated with the nuclear matrix. *Mol Biol Cell* 17: 1711-1722
- Neumann B, Walter T, Heriche JK, Bulkesche J, Erfle H et al., (2010);** Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature* 464: 721-727
- Nordgard O, Dahle O, Andersen TO, Gabrielsen OS (2001);** JAB1/CSN5 interacts with the Gal4 DNA binding domain: A note of caution about two-hybrid interactions. *Biochimie* 83, 969-971
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Bach Kristensen D, Steen H, et al., (2002);** Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 1.5, 376-386
- Ozaki T, Watanabe K, Nakagawa T, Miyazaki K, Takahashi M, Nakagawara A (2003);** Function of p73, not of p53, is inhibited by the physical interaction with

---

RACK1 and its inhibitory effect is counteracted by pRB. *Oncogene* 22: 3231-3242

**Phan D, Cheng CJ, Galfione M, Funda VL, Tunstead J, et al., (2004);** Identification of Sp2 as a transcriptional Repressor of Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 in Tumorigenesis. *Cancer Res* 64: 3072-3078

**Philipsen S, Suske G (1999);** A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* 27: 2991-3000

**Rigas AC, Ozanne DM, Neal DE, Robson CN (2003);** The Scaffolding Protein RACK1 Interacts with Androgen Receptor and Promotes Cross-talk through a Protein Kinase C Signaling Pathway. *J Biol Chem* 278: 46087-46093

**Ron D, Chen CH, Caldwell J, Jamieson L, Orr E, Mochly-Rosen D (1994);** Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of the G proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:839-843

**Ron D, Jiang Z, Yao L, Vagts A, Diamond I, Gordon A (1999);** Coordinated movement of RACK1 with activated betaIIIPKC. *J Biol Chem* 274: 27039-27046

**Ross S, Best JL, Zon JI, Gill G (2002);** SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell* 10, 831-842

**Rotheneder H, Geymayer S, Haidweger E (1999);** Transcription Factors of the Sp1 Family: Interaction with E2F and Regulation of the Murine Thymidine Kinase Promoter. *JMB* 293: 1005-1015

**Sadic D (2009);** Proliferationsanalyse Sp2-defizienter embryonaler Mausfibroblasten und Identifizierung potentieller Zielgene des Transkriptionsfaktors Sp2. *Fachbereich Medizin, Philipps-Universität Marburg*



- 
- Sakai K, Miyazaki J (1997);** A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 318-324
- Sambrook J und Russel DW (2001);** Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.*
- Sapetschnig A, Rischitor G, Braun H, Doll A, Schergaut M, et al., (2002);** Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J* 21, 5206-5215
- Sigiollot FD, Kotsis D, Serre V, Sigiollot SM, Evans DR, Guy HI (2005);** Nuclear Localization and Mitogen-activated Protein Kinase Phosphorylation of the Multifunctional Protein CAD. *J Biol Chem* 280: 25611-25620
- Sinz A (2010);** Investigation of protein-protein interactions in living cells by chemical crosslinking and mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 397:3433-3440
- Stebbins EG, Mochly-Rosen D (2001);** Binding specificity for RACK1 resides in the V5 region of beta II protein kinase C. *J Biol Chem* 276: 29644-29650
- Supp DM, Witte DP, Branford WW, Smith EP, Potter SS (1996);** Sp4, a member of the Sp1 family of zinc finger transcription factors, is required for normal murine growth, viability, and male fertility. *Dev Biol* 176: 284-299
- Suske G (1999);** The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238: 291-300
- Suske G, Bruford E, Philipsen S (2005);** Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics* 85: 551-556
- Tcherkasowa AE, Adam-Klages S, Kruse M-L, Wiegmann K, Mathieu S, et al., (2002);** Interaction with Factor Associated with Neutral Sphingomyelinase Activation, a WD Motif-Containing Protein, Identifies Receptor for Activated C-

---

Kinase as a Novel Component of the Signaling Pathways of the p55 TNF Receptor. *The Journal of Immunology* 169: 5161-5170

**Tyler J, Bulger M, Kamakaka RT, Kobayashi R, Kadonaga JT (1996);** The p55 Subunit of *Drosophila* Chromatin Assembly Factor 1 Is Homologous to a Histone Deacetylase-Associated Protein. *Mol Cell Biol* 16: 6149-59

**de Wit T, Drabek D, Grosveld F (1998);** Microinjection of cre recombinase RNA induces site-specific recombination of a transgene in mouse oocytes. *Nucleic Acids Res* 26: 676-678

**Zhou H, Hu H, Lai M. (2010);** Non-coding RNAs and their epigenetic regulatory mechanisms. *Biol. Cell* 102, 645-655

---

## 5.2 Abkürzungsvezeichnis

A	Adenin
A	Ampere
AA	<i>amino acid</i> , Aminosäure
AD	Aktivierungsdomäne
APS	Ammoniumpersulfat
BD	DNA-bindende Domäne
BTD-Box	Buttonhead-Box
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
Ci	Curie
cko	<i>conditional knock-out</i> , konditioneller knock-out
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
cpm	<i>counts per minute</i> , Zerfälle pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	<i>embryonic day</i> , Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i> , Gelretardationsexperiment
ES	embryonale Stammzellen
for	<i>forward</i> , vorwärts
G	Guanin
h	human
HA	Hämagglutinin-Epitop
HEK	human embryonic kidney cells, humane embryonale Nierenzellen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase

---

IVT	gekoppelte in-vitro Transkription/Translation
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KLF	<i>Krüppel-like Faktor</i>
ko	<i>knock-out</i>
lzn	LacZ-Neomycin Selektionskassette
m	murin
MDa	Megadalton
MEF	murine embryonale Fibroblasten
mRNA	<i>messenger</i> RNA, Boten-RNA
neo	Neomycin
ncRNA	<i>non-coding</i> RNA, nicht-kodierende RNA
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PIC	<i>protease inhibitor cocktail</i> , Protease-Inhibitor Mischung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rev	<i>reverse</i> , rückwärts
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SILAC	<i>stable isotope labeling using amino acids in cell culture</i>
siRNA	<i>short interfering</i> RNA
Sp	<i>specificity protein</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
T	Thymidin
TBE	TRIS-Borat-EDTA Puffer
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TE	TRIS-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	<i>untranslated region</i> , untranslatierter Bereich

---

V	Volt
wt	Wildtyp
Y2H	<i>yeast two hybrid</i> , Hefe-zwei-Hybrid

---

### 5.3 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor Sp2 gehört zur Familie der Sp/KLF Transkriptionsfaktoren. Diese Proteine besitzen eine charakteristische C-terminale DNA-Bindedomäne, die aus drei Zinkfingern vom Typ C2H2 besteht und die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte GC- und GT-Boxen, vermittelt. Diese DNA-Elemente findet man in Promotoren zahlreicher Gene, wie z.B. Haushaltsgene oder Gene, die einer spezifischen Regulation unterliegen.

Über den Transkriptionsfaktor Sp2 war zu Beginn dieser Arbeit wenig bekannt. Eine DNA-Bindung des volle-Länge Proteins in EMSAs konnte nicht nachgewiesen werden, ebenso wenig eine Funktion als transkriptioneller Aktivator. Es gab Hinweise, dass es eine Region im Sp2 Protein gibt, die die DNA Bindung inhibiert oder reguliert, möglicherweise durch die Interaktion mit anderen Proteinen. Die Herstellung einer transgenen Sp2 knock-out Mauslinie zur Untersuchung der Funktion von Sp2 *in vivo* war bereits erfolgt, und es war bekannt, dass Mäuse Sp2-defiziente Mäuse in einem frühen Embryonalstadium sterben.

Die Ziele dieser Arbeit bestanden darin, (I) die DNA-Bindungseigenschaften von Sp2 näher zu untersuchen, (II) zu testen, ob Sp2 mit anderen Proteinen interagiert und diese gegebenenfalls zu identifizieren und (III) die Analyse der Funktion von Sp2 *in vivo* durch die Etablierung von Sp2 knock-out MEFs sowie einer konditionellen Sp2 knock-out Linie zu ermöglichen.

Um die DNA-Bindungseigenschaften von Sp2 im EMSA zu analysieren, wurde neben dem volle-Länge Sp2 Protein eine Reihe von Deletionsmutanten verwendet. Diese Analysen ergaben, dass volle-Länge Sp2 unter keiner der getesteten Bedingungen im EMSA DNA bindet. Zudem wurde gezeigt, dass es im Sp2 Protein mindestens drei Regionen gibt, die die DNA-Bindung inhibieren, wobei der zugrundeliegende Mechanismus nicht aufgeklärt werden konnte. Möglicherweise vermitteln diese Regionen die Interaktion mit anderen Proteinen, die dann die DNA-Bindung von Sp2 inhibieren.

Größenfraktionierungen mittels Gelchromatographie zeigten, dass Sp2 in mehreren hochmolekularen Fraktionen zu finden ist. Dieser Befund ist ein Indiz dafür, dass Sp2 mit anderen Proteinen interagiert. Um diese Interaktionspartner zu identifizieren, wurde ein Hefe-zwei-Hybrid Screen durchgeführt. Zwei Proteine, RNF197 und RACK1, wurden als Interaktionspartner von Sp2 identifiziert. Jedoch konnten diese

---

Interaktionen nicht durch Co-Immunpräzipitationen validiert werden. Um Interaktionspartner von Sp2 mit einer anderen Methode zu identifizieren, wurden unter Verwendung von Sp2-3xFlag Co-Immunpräzipitationen mit anschließender massenspektrometrischer Analyse durchgeführt. Dabei wurden insgesamt 279 potentielle Interaktionspartner gefunden. Zwei von ihnen, E2F6 und PBBP4, wurden ausgewählt, um ihre Interaktion mit Sp2 mittels Co-Immunpräzipitation zu validieren. Jedoch konnten diese Interaktionen weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Um die Funktion von Sp2 *in vivo* untersuchen zu können, sollten Sp2-defiziente MEFs hergestellt werden. Sp2 knock-out MEFs wurden aus E9,5 Embryonen isoliert, allerdings proliferierten diese in Kultur nicht weiter. Um dennoch die Funktion von Sp2 *in vivo* untersuchen zu können, wurde eine Mauslinie hergestellt, die es ermöglicht, Sp2 konditionell zu depletieren. Aus E13,5 Embryonen wurden MEF Kulturen etabliert, die im Rahmen von zwei Diplomarbeiten für weiterführende Experimente verwendet wurden. Dabei wurde gezeigt, dass die Depletion von Sp2 durch die Infektion mit einem Retrovirus, der für Cre-Rekombinase kodiert, die Proliferation dieser Zellen inhibiert. Sp2 ist also sowohl für die normale Entwicklung von Mausembryonen als auch für die Proliferation von Zellen in Kultur essentiell.

---

## 5.4 Summary

The transcription factor Sp2 belongs to the Sp/KLF family of transcription factors. This family is characterized by a C-terminal DNA-binding domain composed of three zinc fingers of the C2H2 type. The zinc finger domains mediate binding to GC-rich DNA elements, so called GC- or GT-boxes. These elements are found in a number of promoters, directing transcription of diverse genes, such as house keeping genes or genes that are regulated by specific stimuli.

When this work was initiated, little was known about the function of the Sp2 protein. DNA-binding of the full length protein was not observed, although the Sp2 zinc finger region showed DNA-binding in EMSAs. Also, activation of reporter genes was not detected. DNA-binding analyses of deletion mutants indicated, that an N-terminal region might inhibit DNA binding of full-length Sp2, possibly by mediating interactions with other proteins. A transgenic Sp2 knock-out mouse line had already been generated and it had been shown, that mice lacking Sp2 protein die during early embryonic development.

The aims of this work were (I) to analyze the DNA-binding properties of Sp2 in more detail, (II) to test if Sp2 interacts with other proteins and, if so, identify these interaction partners, and (III) to establish Sp2 deficient MEFs as well as a conditional Sp2 knock-out mouse line in order to allow further analysis of the biological function of Sp2.

To analyze the DNA-binding capacity of Sp2 in more detail, a series of deletion mutants was examined in EMSA in parallel with full-length Sp2. DNA-binding of full-length Sp2 was never observed under the conditions tested. In addition, it was shown that at least three regions in the Sp2 protein inhibit DNA binding, possibly by mediating protein-protein interactions.

Size exclusion chromatography indicated that Sp2 most likely interacts with other proteins, as Sp2 was found in several high molecular weight fractions. To identify these interacting proteins, a yeast-two-hybrid screen was performed and RNF197 and RACK1 were found to interact with Sp2. But these interactions could not be validated by co-immunoprecipitation experiments. Therefore, a second approach was employed for the identification of interaction partners. Co-immunoprecipitation experiments using Sp2-3Flag were performed followed by mass spectrometric analyses. In total, 279 proteins were found to co-elute with Sp2-3Flag. The potential



---

interactions of E2F6 and RBBP4 with Sp2 were analyzed by co-immunoprecipitation experiments, but could not be validated.

To analyze the function of Sp2 *in vivo*, MEFs were isolated from E9.5 Sp2 knock-out embryos but these MEFs did not proliferate in culture. Therefore, a conditional Sp2 knock-out mouse line was generated and MEFs were isolated from E13.5 embryos for further analysis. Depletion of Sp2 from these MEFs lead to inhibition of proliferation. Therefore, Sp2 is not only essential for normal mouse embryonic development, but also for proliferation of cells in culture.

---

### **5.5 Lebenslauf**

Die Seiten 165-166 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Die Seiten 165-166 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

---

## 5.6 Publikationen

Baur F, **Nau K**, Sadic D, Allweiss L, Elsässer HP, Gillemans N, de Wit T, Krüger I, Vollmer M, Philipsen S, Suske G. (2010); Specificity Protein 2 (Sp2) is Essential for Mouse Development and Autonomous Proliferation of Mouse Embryonic Fibroblasts. *Plos One* 5: A202-A212

Fromme T, Hoffmann C, **Nau K**, Rozman J, Reichwald K, Uttig M, Platzer M, Klingenspor M (2009); An intronic single base exchange leads to brown adipose tissue-specific loss of UCP3 expression and an altered body mass trajectory. *Physiol Genomics* 38: 54-62

**Nau K**, Fromme T, Meyer CW, von Praun C, Heldmaier G, Klingenspor M (2008); Brown adipose tissue specific lack of uncoupling protein 3 is associated with impaired cold tolerance and reduced transcript levels of metabolic genes. *J Comp Physiol B* 178: 269-77

---

## **5.7 Danksagung**

Mein Dank gilt Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl, Prof. Dr. Guntram Suske und Prof. Dr. Sjaak Philipsen für die Betreuung dieser Doktorarbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Guntram Suske für die Möglichkeit, dieses Projekt in seinem Labor zu bearbeiten. Eine so engagierte Betreuung und wissenschaftliche Genauigkeit sind nicht selbstverständlich und es waren sehr lehrreiche Jahre, die ich zu schätzen weiß.

Bei der gesamten AG Suske möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima, die große Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Diskussionen bedanken. Besonders bedanken möchte ich mich für die unzähligen Agarose- und SDS-PAA-Gele, die ihr während meiner Schwangerschaften für mich gegossen, beladen und fotografiert habt. Iris, bei dir möchte ich mich ganz herzlich dafür bedanken, dass du den radioaktiven Teil meiner EMSAs übernommen hast! Juliane und Rolf danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit und für die großartige Stimmung im „kleinen Labor“.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung während dieser nicht immer einfachen Zeit bedanken!

---

## 5.8 Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zur molekularen und biologischen Funktion des Transkriptionsfaktors Sp2“ selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt und alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Baur F, Nau K, Sadic D, Allweiss L, Elsässer HP, Gillemans N, de Wit T, Krüger I, Vollmer M, Philipsen S, Suske G. (2010); Specificity Protein 2 (Sp2) is Essential for Mouse Development and Autonomous Proliferation of Mouse Embryonic Fibroblasts. *Plos One* 5: A202-A212

Marburg, den 05.03.2011

---

Kerstin Nau